

Express Mail Label No.: EV334318808 US

Date of Deposit: February 27, 2004

PATENT APPLICATION

Attorney Docket No. 19904-001 (Formerly 19141-006)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Examiner : Phuong N. Hunyh, Ph.D.  
Group Art Unit : 1644  
Serial No. : 09/331,980 (Confirmation No.: 2351)  
Applicants : Jean-Luc Chagnaud, *et al.*  
Filed: : November 26, 1999  
For : ANTIBODIES SPECIFICALLY RECOGNIZING A  
NITROSYLATED PROTEIN, THEIR METHOD OF  
PREPARATION, THERAPEUTIC USE AND DIAGNOSIS

**RECEIVED**  
MAR 08 2004

New York, New York  
February 27, 2004

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**VERIFIED STATEMENT**

For the Examiner's convenience, a Certified Priority Document No. FR 96/16207 has been submitted in the above-referenced application. The undersigned verifies that PCT/FR97/02412 is an accurate translation of FR 96/16207. Further, United States Application Serial Number 09/331,980 is an accurate translation of PCT/FR97/02412.

Respectfully submitted,

Ivor R. Elrifi, Reg. No. 39,529  
Scott D. Miller, Reg. No. 43,803  
Attorneys for Applicants  
MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS,  
GLOVSKY AND POPEO, P.C.  
Chrysler Center, 666 Third Avenue, 24 Fl.  
New York, New York 10017  
Tel: (212) 935-3000  
Fax: (212) 983-3115



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE CERTIFIÉE CONFORME

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le titre de propriété industrielle, correspondant à la demande ci-annexée, a été délivré le 19 mars 1999.

Fait à Paris le 13 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30  
<http://www.inpi.fr>

**THIS PAGE RI AN**



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>96 16 207 -</b> DEPARTEMENT DE DÉPÔT <b>n</b> DATE DE DÉPÔT <b>30 DEC. 1996</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>BREESE-MAJEROWICZ</b> <b>3, avenue de l'Opéra</b> <b>75001 PARIS</b>	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale		n° du pouvoir permanent <b>F17B18FR</b> références du correspondant <b>01.47.03.67.77</b> téléphone <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° date	
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
Titre de l'invention (200 caractères maximum)  <p style="text-align: center;"><b>ANTICORPS RECONNAISSANT SPÉCIFIQUEMENT UNE PROTÉINE NITROSYLÉE, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION, LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE ET DIAGNOSTIC.</b></p>			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination  <b>-CNRS - Centre National de la Recherche Scientifique</b>		Forme juridique	
Nationalité (s) <b>FRANCAISE</b>		Adresse (s) complète (s) Pays <b>3, rue Michel Ange</b> <b>75015 PARIS</b> <b>FRANCE</b>	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)  <b>Marc MAJEROWICZ</b> <b>960703</b>		SIGNATURE DU PRÉPOSE À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30 F 17B18PCT

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96/16207

TITRE DE L'INVENTION :

ANTICORPS RECONNAISSANT SPECIFIQUEMENT UNE PROTEINE NITROSYLEE, LEUR  
PROCEDE DE PREPARATION, LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE ET DIAGNOSTIC.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE-MAJEROWICZ

3, avenue de l'Opéra

75001 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

CHAGNAUD Jean-Luc

20, rue Montesquieu

33650 LA BREDE

GEFFARD Michel

200, avenue de Thouars

33400 TALENCE

VEYRET Bernard

3, rue Kruger

33600 PESSAC

VINCENDEAU Philippe

12, allée du bois de Bernis

33600 PESSAC

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 24 Décembre 1997

Marc MAJEROWICZ

970703

ANTICORPS RECONNAISSANT SPÉCIFIQUEMENT UNE  
PROTÉINE NITROSYLÉE, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION, LEUR  
UTILISATION THERAPEUTIQUE ET DIAGNOSTIC.

5           La présente invention concerne des anticorps  
reconnaissant spécifiquement une protéine nitrosylée et  
avantageusement les composés résultant de la conjugaison  
de NO avec ses transporteurs, comme l'albumine.  
L'invention se rapporte aussi à des compositions  
10 immunogènes pour la préparation de tels anticorps  
polyclonaux ou monoclonaux. L'invention a encore pour  
objet les compositions pharmaceutiques comprenant comme  
principe actif ces anticorps, et leur utilisation pour le  
traitement de pathologies impliquant le monoxyde d'azote,  
15 ses dérivés et conjugués, notamment dans les situations où  
il y a une hyperproduction de NO. L'invention concerne  
enfin l'utilisation de ces anticorps pour la détection de  
composés nitrosylés et le diagnostic des pathologies  
impliquant ces composés.

20           Le monoxyde d'azote, ci-après désigné aussi NO,  
est décrit comme étant la plus petite molécule élaborée  
par les cellules. D'abord assimilé à l'EDRF, il a ensuite  
été reconnu comme neuromédiateur, et serait le premier  
25 neurotransmetteur à activité rétrograde, ainsi que comme  
molécule cytotoxique/cytostatique. Du fait de sa forte  
réactivité, le monoxyde d'azote est susceptible de réagir  
avec un grand nombre de molécules pour former des  
conjugués possédant de multiples fonctions et participer  
30 ainsi à des nombreux mécanismes physiologiques et  
physiopathologiques.

          Le monoxyde d'azote, produit en grande quantité  
ou de façon inadéquate est impliqué dans un grand nombre  
de mécanismes physiopathologiques, comme les infections,  
35 les chocs septiques, les maladies dégénératives et  
autoimmunes, les rejets de greffe, et son action est  
souvent relayée par celle de ses dérivés et conjugués.

Ainsi, l'albumine nitrosylée possède une activité hypotensive, expliquant la durée d'action du NO. De même, la nitrohémoglobine a récemment été décrite comme agissant sur la vasodilatation.

5            Afin de palier les effets néfastes de la production en grande quantité ou de façon inadéquate du NO ou de ses conjugués, il a été proposé dans l'art antérieur d'utiliser des inhibiteurs de l'enzyme NO-synthase. On a observé toutefois que ces inhibiteurs ne sont pas actifs  
10 sur des molécules déjà formées et qu'en outre, leur distribution dans l'organisme et leur toxicité limitent leur utilisation.

La présente invention vise précisément à palier ces inconvénients en proposant des molécules biologiques  
15 agissant sélectivement sur les molécules transportant le monoxyde d'azote.

En outre, la détection de substances nitrosylées permettrait de révéler des molécules ou tissus cibles  
20 impliqués dans les pathologies citées précédemment. Il a été ainsi proposé dans l'art antérieur d'utiliser des anticorps anti-nitrotyrosine pour mettre en évidence la tyrosine nitrée, qui est le marqueur de la formation du peroxy-nitrite, résultant de la réaction entre l'anion superoxyde  $O_2^-$  avec NO, dans de nombreuses pathologies.  
25

La présente invention vise aussi à fournir de nouveaux moyens de détection de molécules nitrosylées utiles pour le diagnostic de pathologies impliquant celles-ci.  
30

Ces buts sont atteints selon l'invention grâce à des anticorps purifiés reconnaissant spécifiquement une protéine nitrosylée, et avantageusement des composés résultant de la conjugaison de NO avec ses transporteurs.  
35 Parmi-ceux-ci, l'invention concerne tout particulièrement des anticorps purifiés dirigés contre les albumines nitrosylées. On entend dans ce qui suit par protéine

nitrosylée, également les peptides et polypeptides nitrosylés et plus généralement tout conjugués antigénique nitrosilé.

5 Les anticorps de l'invention présentent de nombreux avantages, notamment en ce qui concerne leur rapidité d'action et leur efficacité sur des molécules  
10 nitrosylées déjà formées et actives. En outre, leur capacité de diffusion dans un organisme est limitée aux propriétés physicochimiques des immunoglobulines. Outre leur efficacité, les anticorps de l'invention présentent  
15 l'avantage d'être très spécifiques et non toxiques.

Les anticorps sont des macromolécules élaborées par les organismes en réponse à la présence d'une  
20 substance étrangère. Des anticorps d'origine animale ont été utilisés de longue date en thérapeutique humaine. Par exemple, le sérum de cheval a été utilisé comme anticorps antitétanique après immunisation de celui-ci par la toxine  
25 tétanique.

20 Les travaux de recherche ayant conduit à la présente invention ont débuté par l'induction d'anticorps polyclonaux dirigés contre une protéine nitrosylée, normalement plus stable *in vivo* qu'un acide aminé  
25 nitrosylé. En outre, les différentes réponses immunes ont été étudiées en modifiant non seulement les épitopes et leur présentation mais aussi l'espèce animale. L'invention concerne également un ensemble d'anticorps polyclonaux  
30 précédents obtenus en injectant à un animal un immunogène décrit ci-après. Puis, dans un second temps, des anticorps monoclonaux ont été préparés selon les méthodes classiques de fusion cellulaire.

35 NO possède une grande affinité pour la cystéine et la tyrosine et en s'y fixant. Il est impliqué dans des multiples fonctions qui pourraient être liées à des processus de transport, de stockage, et finalement de relargage de NO au niveau de ses sites d'action.

Des anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été réalisés en utilisant différentes molécules antigéniques nitrosylées. Pour les rendre immunogéniques, les acides aminés (haptènes) ont été couplés à des protéines porteuses par l'intermédiaire de différents agents couplants. Ainsi, l'albumine, qui est la protéine la plus abondante du plasma, stocke et transporte le NO, et il a été montré que cette albumine nitrosylée possède une activité vaso-dilatatrice importante et également cytotoxique et cytostatique. Cette propriété de l'albumine est due à la présence d'une cystéine dont l'affinité pour le NO est élevée. Les travaux de recherche réalisés par les Inventeurs et rapportés ci-après, ont permis de préparer des anticorps poly et mono-clonaux dirigés contre des conjugués de NO et de résidus d'acide aminés, la cystéine, le tyrosine et le tryptophane, eux-mêmes couplés à une protéine porteuse, la sérum albumine humaine ou bovine. Puis, les anticorps spécifiques de la sérum albumine nitrosylée ont été sélectionnés et ont été utilisés pour reconnaître et neutraliser certaines des propriétés de ce conjugué *in vitro*.

En synthétisant plusieurs formes d'immunogènes, les Inventeurs ont montré que ces composés sont suffisamment stables pour induire une réponse immune et que celle-ci est spécifiquement dirigée contre l'épitope nitrosylé correspondant. La possibilité d'induire ces anticorps et l'intervention de nitrosothiols et de cystéine dans les mécanismes de vasodilatation (Ignarro et al., 1981), ont amené les Inventeurs à rechercher l'existence de dérivés nitrosylés *in vitro* et *in vivo* et à bloquer leurs effets.

L'invention concerne aussi les immunogènes pour la préparation des anticorps définis ci-dessus. Ces immunogènes sont constitués d'un acide aminé nitrosylé couplé à une protéine porteuse. La synthèse de ces immunogènes est réalisée par exemple en couplant l'haptène

L-tyrosine (Tyr) ou L-cystéine-N-acétylée (Cys) à une protéine porteuse telles que la sérum albumine bovine (SAB) ou la sérum albumine humaine (SAH) par la carbodiimide. Puis, les conjugués obtenus sont nitrosylés par un donneur de NO comme le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) en milieu acide. L'utilisation de différents agents couplants tels que la carbodiimide, le glutaraldéhyde (G) ou l'anhydride succinique (AS) et de protéines, peptides ou polypeptides porteurs distincts, permet d'obtenir des épitopes associés à la nitrosylation de conformation différente.

Ces immunogènes peuvent également être constitués d'une protéine dont la séquence possède un résidu d'acide aminé capable d'être nitrosylé comme l'albumine qui possède une cystéine.

Dans les immunogènes de l'invention ci-dessus, on entend par protéine porteuse également les peptides et polypeptides.

Les conjugués nitrosylés suivants ont été préparés dans le cadre de l'invention : NO-Tyr-SAB; NO-Cys(acétylée)-SAB; NO-Cys(non acétylée)-SAB; NO-Tyr-G-SAB; NO-Cys-G-SAB; NO-Tyr-SA-SAB; NO-Cys-SA-SAB; NO-Tryp-SAB; NO-Tryp-G-SAB; NO-SAB. La préparation de ces antigènes nitrosylés a permis le développement d'anticorps polyclonaux et monoclonaux qui ont servi à la détection de la nitrosylation de molécules de l'organisme (SAB) ou d'agents pathogènes et à la neutralisation de leur activité. La production d'Ac spécifiquement dirigés contre des immunogènes portant un épitope nitrosylé est délicate, car de nombreux couplages de différentes petites molécules à des protéines porteuses se sont révélés efficaces chez une espèce animale et pas chez une autre. Ceci a été remarqué lors de la modification de la présentation de l'antigène. Chez le lapin par exemple, deux immunogènes se sont révélés efficaces, le NO-Cys(acétylée)-SAB et le NO-Tyr-SAB, où l'agent couplant utilisé est la carbodiimide. L'élaboration de ces sérums

immuns de lapin a permis d'entreprendre le développement d'anticorps monoclonaux murins. La réalisation de ceux-ci a tout d'abord nécessité la production des Ac polyclonaux chez la souris, où seul le couplage au glutaraldéhyde a permis d'obtenir de bons résultats. Ces derniers ont été obtenus uniquement lors de l'utilisation de l'immunogène NO-Cys-G-SAB. Pour les autres conjugués, les réponses obtenues n'ont pas été spécifiques de l'épitope nitrosylé. En conséquence, la présentation de l'immunogène *in vivo*, est un élément déterminant pour stimuler la réponse immunitaire, et obtenir une approche réussie contre des petites molécules nitrosylées.

Les travaux de recherche réalisés par les Inventeurs ont permis de mettre en évidence des activités portées par des molécules nitrosylées et de les neutraliser grâce à la réalisation d'anticorps dirigés contre des épitopes nitrosylés. En conséquence l'invention concerne les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif un anticorps de l'invention avantageusement dispersé dans un véhicule ou des excipients pharmaceutiquement acceptables. L'invention concerne aussi l'utilisation des anticorps de l'invention pour la préparation de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies dans lesquelles NO, ses dérivés ou conjugués sont impliqués, comme les infections par des microorganismes et des parasites, les maladies autoimmunes et inflammatoires, le choc septique, les cancers, le rejet de greffe, la neurotoxicité,... La surproduction de "NO-lié" serait responsable de l'effet délétère du NO dans certaines pathologies, et pourrait donc être neutralisée par les anticorps de l'invention avantageusement et préalablement humanisés.

Les Inventeurs ont en effet mis en évidence *in vivo* le rôle de NO dans le développement des maladies autoimmunes et inflammatoires. Jusqu'à présent, les inhibiteurs de la NO-synthase constituent les molécules



les plus utilisées pour le blocage de l'activité de NO dans des conditions pathologiques données. Les travaux réalisés dans le cadre de la présente sur deux maladies expérimentales : l'encéphalite autoimmune et l'arthrite inflammatoire expérimentales chez la ratte Lewis, ont permis de montrer l'utilité des anticorps de l'invention comme inhibiteurs de l'effet nocif de NO ou de ses dérivés

Les anticorps de l'invention sont extrêmement utiles sur les plans physiologiques et physiopathologiques tant pour des applications thérapeutiques que diagnostiques. Ils permettent en effet de détecter la synthèse de molécules portant des épitopes NO-cystéine et donc d'élucider de nouveaux mécanismes et de traiter des affections faisant intervenir le monoxyde d'azote, ses dérivés et conjugués, notamment dans les situations où l'on est confronté à une hyperproduction de NO, tels que les infections, les chocs, les inflammations aiguës ou chroniques (systémiques ou localisées), les transplantations, les maladies dégénératives, les diabètes, les maladies auto-immunes, les cancers, etc...

Aussi, l'invention concerne un procédé de détection *in vitro* de protéines nitrosylées dans un échantillon biologique, comme un fluide ou un tissu, comprenant au moins les étapes suivantes :

- la mise en contact de cet échantillon avec au moins un anticorps de l'invention ou un ensemble de ces anticorps, éventuellement marqués, dans des conditions permettant la formation de complexes immunologiques;
- la détection d'un complexe immunologique antigène-anticorps par des méthodes physiques ou chimiques.

L'invention concerne aussi un kit pour la détection *in vitro* de protéines nitrosylées dans un échantillon biologique, notamment pour le diagnostic de

pathologie impliquant le NO, ses dérivés et conjugués.  
Ce kit comprend :

- au moins un anticorps de l'invention ou un ensemble de ces anticorps éventuellement marqués;
- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique entre ledit anticorps et les protéines nitrosylées éventuellement présentes dans un échantillon biologique;
- éventuellement un ou plusieurs réactifs de détection éventuellement marqués aptes à réagir avec les complexes immunologiques éventuellement formés;
- éventuellement un ou plusieurs réactifs biologiques de référence et de contrôle.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent concernant :

- la caractérisation et les fonctions de NO;
- la préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre des conjugués nitrosylés;
- la détection et neutralisation de dérivés de NO par les anticorps polyclonaux;
- la préparation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des conjugués NO-cys-glutaraldehyde couplés à une protéine porteuse;
- La détection d'antigènes nitrosylés et le rôle protecteur des anticorps monoclonaux.

#### I - CARACTÉRISATION ET FONCTIONS DU MONOXYDE D'AZOTE.

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique est un gaz diatomique radicalaire. Il est produit enzymatiquement par plusieurs isoformes de l'enzyme NO-synthase. La synthèse de NO a lieu dans de nombreux types cellulaires. Ceci explique en partie, son implication dans une très large variété de fonctions biologiques (Moncada et al., 1991;

Knowles et Moncada, 1992; Lowenstein et Snyder, 1992; Nathan, 1992; Stamler et al., 1992a).

a) La synthèse de NO :

5 La formation de NO se fait par oxydation de la L-arginine au niveau de l'azote terminal de la fonction guanidine. La production de NO à partir de l'arginine entame la formation simultanée de L-citrulline (Marletta et al., 1988). L'oxydation de la L-arginine est contrôlée  
10 par la NOS et nécessite la présence de l'oxygène moléculaire et de cofacteurs tels que la flavine adénine dinucléotide (FAD), le flavine mononucléotide (FMN), la tétrahydrobioptérine (BH4), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Marletta, 1993; 1994).

b) Les différentes formes de NO-synthase (NOS) :

Plusieurs types de NOS ont été clonés et classés en deux familles distinctes: les NOS dites constitutives (cNOS) et les NOS inductibles (iNOS).

20 Une différence fondamentale entre ces isoformes concerne l'activité NOsynthase *in situ* (Bredt et al., 1991; Moncada et al., 1991; Hevel et Marletta, 1992; Lamas et al., 1992; Nathan, 1992): Les cNOS sont calcium /calmoduline dépendantes et produisent de faibles  
25 quantités de NO (picomoles/min/mg protéine) sur des périodes brèves en réponse à l'activation de récepteurs dans des conditions physiologiques (Stuehr et Griffith, 1992). Ces enzymes sont généralement trouvées dans les cellules endothéliales, les neurones, les astrocytes, les  
30 plaquettes, les polynucléaires neutrophiles et les glandes surrénales (Moncada et al., 1991; Lacaze-Masmonteil, 1992; Nussler et al., 1995). Les iNOS sont calcium / calmoduline indépendantes. Elles sont induites par des cellules immunocompétentes, principalement par l'intermédiaire de  
35 cytokines, et de nombreuses autres molécules, en particulier dérivées de microorganismes (Moncada et al., 1991). La stimulation des iNOS entraîne la synthèse de

grandes quantités de NO (nanomoles/min/mg protéine) pendant de longues périodes (Nathan et Xie, 1994). Ces décharges de NO sont responsables des phénomènes cytostatiques et cytotoxiques. On trouve ces iNOS dans les  
 5 macrophages activés, les cellules musculaires, les hépatocytes, les fibroblastes, les astrocytes, polynucléaires neutrophiles et les cellules endothéliales (Stuehr et Griffith, 1992; Marletta, 1993; Anggard, 1994).

Chez l'homme, une iNOS a été mise en évidence  
 10 dans les hépatocytes et les cellules musculaires lisses de l'aorte (Geller et al., 1993), dans les chondrocytes (Palmer et al., 1993), les kératinocytes (Heck et al., 1992), les astrocytes (Lee et al., 1993) et les îlots de Langerhans où l'induction de la NOS par l'interleukine 1  
 15 (IL-1) pourrait participer à la destruction de ces cellules (Corbett et al., 1993). Plus récemment, une production de NO a été mise en évidence dans les monocytes humains par un mécanisme de transduction impliquant le CD23 (Dugas et al., 1995).

20

#### c) Les inhibiteurs de NOS :

De nombreuses arginines N-substituées ont été synthétisées comme inhibiteurs spécifiques des NOS parmi lesquelles: la Nco monométhyl-L-arginine (NMMA) qui est un  
 25 bon inhibiteur des trois isoformes et la Nco-nitro L-arginine qui est plus active sur cNOS (Stuehr et Griffith, 1992). L'aminoguanidine est plus active sur la iNOS (Misko et al., 1993). D'autres inhibiteurs des différentes isoformes des NOS ont été récemment mis en  
 30 évidence tels que la thiocitrulline (Southan et al., 1995) et le 7-nitro-indazole (Mayer et al., 1994).

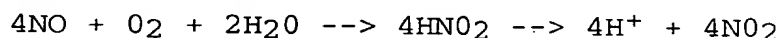
#### d) La chimie et la biochimie de NO :

Le monoxyde d'azote, contrairement à la plupart  
 35 des radicaux libres, ne se dimérise et ne se dismute pas. Sa réactivité dépend essentiellement de ses capacités à céder son électron célibataire à d'autres radicaux (ion

superoxyde, radical tyrosyl, etc.) ou à des espèces susceptibles d'intervenir dans des réactions radicalaires (oxygène moléculaire, thiols, phénols, etc.) ou encore aux métaux de transition avides d'électrons (fer, cuivre...) (Stamler et al., 1992a). NO est soit complexé, soit transformé en ion nitrosonium NO<sup>+</sup>. Le potentiel d'oxydo-réduction du milieu environnant est déterminant pour le devenir de NO en NO<sup>+</sup> et NO<sup>-</sup>. Cependant, l'existence de ces deux ions n'a jamais été démontré dans les milieux physiologiques.

- Réaction de NO avec l'oxygène :

NO est oxydé en nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en présence d'oxygène (Farkas et Menzel, 1995). Sa durée de vie in vivo dépend essentiellement de cette réactivité avec l'oxygène. A l'état gazeux, il se forme le dioxyde d'azote radicalaire (NO<sub>2</sub><sup>°</sup>), qui se dimérise en N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> et qui se dissout dans l'eau en donnant les acides nitreux et nitrique. A l'état dissous et à pH 7,4, le mélange de NO<sup>°</sup> et d'oxygène ne génère que NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, mais pas de nitrate, avec la stoechiométrie suivante:

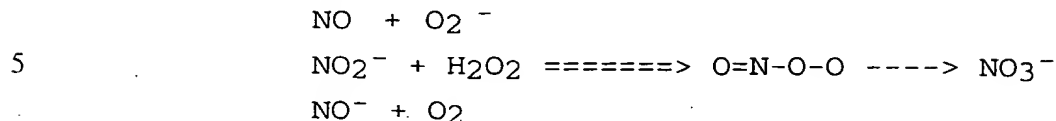


- Réaction avec l'anion superoxyde :

Les dérivés de l'oxygène, l'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le radical hydroxyl (HO) et l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sont générés dans des processus métaboliques normaux et pathologiques. Simultanément à NO, l'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>, produit par la NADPH oxydase, est sécrété par divers tissus en particulier lors d'inflammations ou de chocs septiques. Le couplage des radicaux NO et O<sub>2</sub><sup>-</sup> donne du peroxynitrite avec une constante de réaction de 6,7 x 10<sup>9</sup> mol<sup>-1</sup> L s<sup>-1</sup>.

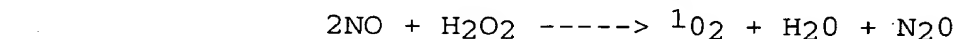
En fait, la constante de réaction de la SOD avec O<sub>2</sub><sup>-</sup> étant de (2 x 10<sup>9</sup> mol<sup>-1</sup> L s<sup>-1</sup>) NO et la superoxyde dismutase (SOD) sont en compétition pour piéger O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Koppenol et al., 1992). Le peroxynitrite peut aussi se

former par la réaction de  $\text{NO}_2^-$  avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou de l'anion nitroxyle ( $\text{NO}^-$ ) avec l'oxygène (Fontecave et Pierre, 1994; Butler et al., 1995):



- Réaction avec le peroxyde d'hydrogène:

$\text{H}_2\text{O}_2$  peut réagir directement avec  $\text{NO}$ . Sa concentration dans les milieux biologiques est supérieure à celle de  $\text{O}_2^-$  (Fontecave et Pierre, 1994). La réaction ne donne pas  $\text{ONOO}^-$  mais de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) détectable par chimioluminescence:



Cet oxygène singulet formé est très réactif et peut participer à la destruction cellulaire et à des processus inflammatoires pendant l'activation des macrophages.

20 Réaction avec les thiols:

Les thionitrites, telle que la S-nitrosocystéine ou la nitrosoalbumine, de durée de vie supérieure à celle de  $\text{NO}$ , seraient les composés susceptibles de le transporter depuis la NOS jusqu'à la cible de  $\text{NO}$ .

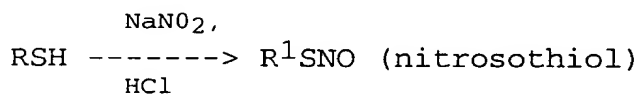
25 Les thionitrites peuvent se former par nitrosylation à partir de thiols libres présents dans le cytosol cellulaire et le sang (Girard et Potier, 1993). La formation de thionitrites à la suite de l'activation de la NOS *in vivo* a été souvent décrite : elle pourrait jouer un rôle dans la modulation de certaines activités enzymatiques ainsi que dans le transport de  $\text{NO}$ .

30 De nombreux travaux ont mis en évidence la nitrosylation de groupement SH libre de la cystéine libre ou de la sérum albumine bovine (Cys 34). Récemment, il a été démontré que le  $\text{NO}$  libéré dans un système biologique réagit en présence de thiols pour former des dérivés S-nitrosoprotéines. En effet, les protéines plasmatiques

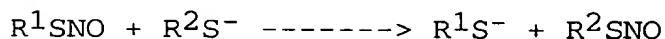
servent de réservoir de NO produit par les cellules endothéliales (Stamler et al., 1992b).

Chez l'homme, le plasma contient environ 7 M S-nitrosothiols dont 96% sont sous la forme de S-nitrosoprotéines, parmi lesquelles on trouve 82% de S-nitroso-sérum-albumine (Stamler et al., 1992b). La concentration plasmatique des thiols est de 0,5 mM et la concentration plasmatique de NO est de 3 nM (Stamler et al., 1992b). Le NO libre a une demi-vie de quelques secondes à quelques minutes (Kelm et Schrader, 1990). Dans le plasma, sous la forme SNO-Cys ou S-NO-protéine, il a une demi-vie plus élevée, respectivement 10 et 40 min (Ignarro et al., 1981; Ignarro, 1989; Stamler et al., 1992c). Dans un tampon phosphate à pH 7,4 à 25°C, NO-SAB a une demi-vie d'environ 24 heures (Stamler et al., 1981, 1992c,d) qui passe à 12 heures à 37°C (Stamler et al., 1992c). Dans ces mêmes conditions, NO et S-nitrosocystéine ont respectivement une demi-vie de 0,1-1 s (Kelm et Schrader, 1990) et 15-30 s (Ignarro et al., 1981).

*In vitro*, le traitement des thiols en milieu acide avec un agent nitrosant tel que  $\text{NaNO}_2$ , donne la réaction suivante (Fontecave et Pierre, 1994):

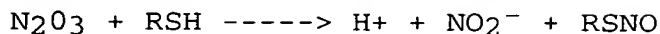
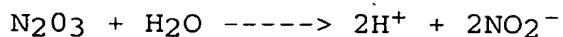
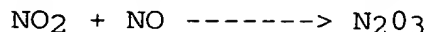
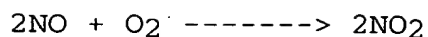


Le nitrosothiol formé peut transférer NO à un second thiol ou un autre nucléophile par un mécanisme de transnitrosylation (Butler et al., 1995):



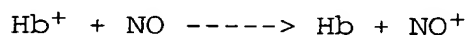
#### - Réaction avec la sérum albumine:

A pH 7, NO ne réagit pas directement avec les thiols pour donner les nitrosothiols mais la formation de ces derniers est observée en milieu oxygéné. Des données récentes montrent que pour des thiols de faible poids moléculaire (N-acétyl-Cys, glutathion,...), l'agent nitrosant essentiel est le  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Kharitovov et al., 1995) selon les réactions suivantes:



5

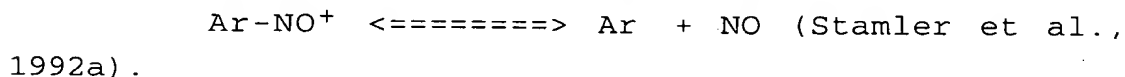
En revanche, dans le cas des deux protéines  
sérum albumine humaine et bovine la situation est  
différente car la vitesse de la réaction est 10 fois  
moindre que celle des thiols de faible poids moléculaire  
10 (3-1,5 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, contre 0,3-0,06 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Leur  
nitrosylation par le N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> n'est donc pas significative.  
Keaney et al., (1993) suggéraient la possibilité de la  
nitrosylation de la SAH par sa réaction avec le NO<sup>+</sup> qui  
pourrait être formé à la suite de la réaction de NO avec  
15 les Fe<sup>2+</sup> des hémoprotéines telle que l'hémoglobine  
(Kharitonov et al., 1995):



- Réaction avec la tyrosine :

20

La tyrosine possédant un groupement aromatique,  
la nitrosylation se fait par transfert de charges entre  
NO<sup>+</sup> et ce groupe aromatique donneur d'un électron :



25

Cette réaction peut avoir lieu au niveau d'une  
protéine contenant un acide aminé radicalaire au niveau de  
son site actif. Tel est le cas de la ribonucléotide  
réductase (Fontecave et Pierre, 1994). Au niveau de la  
sous-unité R<sub>2</sub> de cette enzyme, il y a un radical tyrosyl  
30 stable qui est essentiel pour l'activité enzymatique. La  
réaction réversible de ce radical avec NO peut expliquer  
en partie le mécanisme régulateur de ce dernier au niveau  
de l'enzyme.

35

- Réaction avec les métaux de transition :

De nombreuses cibles de NO se sont révélées être  
les métalloprotéines. En effet, NO peut se fixer à tous



les métaux de transition. De ce fait, il est utilisé comme inhibiteur des protéines du transport et du métabolisme de l'oxygène: hémoglobine, myoglobine, oxydases, oxygénases, etc... L'affinité de NO est généralement beaucoup plus forte pour  $\text{Fe}^{2+}$  que pour  $\text{Fe}^{3+}$ . NO se fixe aussi au  $\text{Co}^{2+}$  dans plusieurs de ses états d'oxydation, et à  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ . NO peut agir aussi comme réducteur vis-à-vis de certaines métalloprotéines (Henry et al., 1991; Stamler et al., 1992a; Traylor et Sharma, 1992; Henry et al., 1993).

e) Les rôles physiologiques et pathologiques de NO :

- Rôle de NO dans le système cardiovasculaire :

Dès 1980, Furchgott et Zawadski ont observé que la relaxation des artères isolées soumises à l'action de l'acétylcholine dépend de l'endothélium (Furchgott et Zawadski, 1980). Ils en ont déduit l'existence d'un facteur fugace appelé "endothelium derived relaxing factor" (EDRF), sécrété par les cellules endothéliales traitées à l'acétylcholine ou à la bradykinine, entraînant l'élongation des cellules musculaires lisses adjacentes. Sa nature chimique, n'a été reconnue qu'en 1987 par Palmer et Moncada (Palmer et al., 1987, 1988; Ignarro et al., 1987).

Outre l'action EDRF, NO radicalaire possède un effet sur les plaquettes: l'augmentation de GMPc sous son contrôle provoque une diminution de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaires (Radomski et al., 1987). Chez l'homme NO est utilisé sur le plan thérapeutique: la molsidomine par exemple constitue un donneur de NO utilisé comme agent vasodilatateur dans le traitement d'un certain nombre d'affections cardiovasculaires.

NO est aussi directement utilisé en inhalation sous forme gazeuse à la dose de 10 à 40 p. p. m. dans certains services de réanimation, dans le but de provoquer une vasodilatation de la circulation pulmonaire, et donc d'améliorer les échanges gazeux respiratoires, dans le

cadre du traitement de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire sévère ou de syndrome de détresse respiratoire aigu de l'adulte (ARDS) (Pepke-Zaba et al., 1991; Falke et al., 1991).

5                   . Production massive de NO :

Un excès de production de NO peut avoir des conséquences nocives vis-à-vis du système cardiovasculaire. Dans le choc septique par exemple, il y a sécrétion massive de NO non seulement par les cellules endothéliales  
10                   mais aussi par les mastocytes, les fibres musculaires lisses, les leucocytes et les cellules rénales. Cette libération importante de NO est due à l'induction de la iNOS (Anggard, 1994). L'excès de NO synthétisé est responsable de l'hypotension, de l'hyporéactivité  
15                   vasculaire et de la dépression myocardique (Lancaster, 1992) dans le choc septique expérimental à endotoxine, ou cytokines (Kilbourn et al., 1990; Reed et al., 1990; Thiernemann et Vane, 1990; Gray et al., 1991; Vallance et Moncada, 1993) et peut provoquer une destruction  
20                   tissulaire (Palmer et al., 1992).

Chez l'homme, il a été démontré que l'utilisation de NMMA chez des patients présentant un choc septique provoque une augmentation dose dépendante de la pression artérielle (Petros et al., 1994). Ces résultats  
25                   indiquent la contribution de NO dans des changements au niveau cardiovasculaire et suggèrent un rôle éventuel des inhibiteurs de la NOS dans la thérapie du choc septique.

                  . Production diminuée de NO

Un défaut de production de NO pourrait être à  
30                   l'origine de certaines élévations tensionnelles. Ainsi, chez le rat génétiquement hypertendu, sensible au sel (rats Dahl), l'administration de L-arginine abaisse la pression artérielle (Chen et Sanders, 1991). Cette diminution de la pression artérielle peut être la  
35                   conséquence de la stimulation de la production de NO.

Dans les modèles expérimentaux d'athérosclérose, il a été démontré une réduction de la libération de NO par

l'endothélium vasculaire chez les lapins (Coene et al., 1985). Il est possible que la destruction de l'endothélium, notamment par l'athérosclérose, entraîne une incapacité à synthétiser correctement du NO, avec pour  
 5 conséquence une diminution de la vasorelaxation et, peut être, un effet permissif sur la prolifération cellulaire.

Ainsi, l'hypertension ou d'autres troubles de la pression sanguine pourrait provenir d'une production anormale de NO. Il s'avère maintenant que la réponse  
 10 vasodilatatrice dépendante de l'endothélium est diminuée dans les modèles animaux d'hypertension, ainsi qu'en cas d'athérosclérose et de maladie coronarienne chez l'homme.

- Rôle de NO dans le système nerveux :

Produit sous l'influence de la stimulation des récepteurs de type NMDA présynaptiques par le glutamate, et agissant par l'intermédiaire de l'augmentation du taux intraneuronal postsynaptique de GMPc (Green et al., 1991), NO exerce, aussi bien chez le murin que chez l'homme, une  
 15 action de signal dans le système nerveux, non seulement central (Bredt et Snyder, 1989), mais aussi périphérique.

En neurophysiologie NO est maintenant considéré comme un messenger biologique (Garthwaite, 1991) ou un messenger rétrograde (Barinaga, 1991; Feldman et al., 1993). Il pourrait avoir un rôle dans la potentialisation à long terme (PLT) dans l'hippocampe. La PLT est un phénomène qui correspond à une augmentation particulière de l'efficacité de la transmission synaptique favorisant ainsi la mémorisation. Ceci indique une implication de la  
 25 production de NO dans certaines formes d'apprentissages dépendant de l'hippocampe (Bredt et Snyder, 1990; Bredt et al., 1991; Zhuo et al., 1993).

Il constitue un neurotransmetteur non cholinergique, non adrénergique, et médiateur de la  
 35 relaxation du tube digestif (Desai et al., 1991); et participe aussi bien au contrôle neuronal du tonus vasculaire cérébral (Beckman, 1991), ou de l'érection

(Rajfer et al., 1992), qu'à celui de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (Schmidt et al., 1992).

Par ailleurs, NO est impliqué dans des processus  
 5 de destruction du cerveau, après des chocs aigus, tels que l'ischémie-hypoxie (Moncada et al., 1991; Snyder et Bredt, 1992; Choi, 1993). Le NO formé au cours de l'ischémie serait neurotoxique par plusieurs mécanismes. Le NO réagit avec les ions superoxydes pour former des peroxynitrites  
 10 qui initient la peroxydation lipidique (Beckman, 1990). Le NO est capable de bloquer la respiration mitochondriale (Drapier et al., 1988) et d'inhiber la synthèse d'ADN (Kwon et al., 1993). En plus de ces effets cytotoxiques directs, NO exercerait un effet en favorisant la  
 15 libération de glutamate survenant au cours de l'ischémisme (Buisson et al., 1993) ce qui déclenche une entrée d'ions calcium qui se lient à la calmoduline, conduisant à l'activation de la NOS. Le NO produit diffuse à travers les membranes cellulaires et parvient aux cellules cibles  
 20 où il se lie à l'atome de fer du site actif de la guanylate cyclase soluble. Celle-ci produit alors le GMPc. De plus, NO libéré peut agir au niveau pré-synaptique où il facilite la libération de glutamate.

Cependant, il a été démontré *in vitro* que  
 25 l'addition directe de NO ou de molécules libérant NO sur des cultures de neurones, bloque l'activation des récepteurs NMDA (Manzoni et al., 1992). Ces observations ont conduit les auteurs à suggérer que le NO endogène synthétisé par les neurones exerce une activité de  
 30 rétro-inhibition vis-à-vis des récepteurs NMDA. Ce rétro-contrôle s'exercerait en diminuant la fréquence d'ouverture des canaux associés aux récepteurs et par conséquent en réduisant l'influx calcique. Cet effet serait dû à un blocage par le NO du site modulateur du  
 35 récepteur NMDA (Lipton et al., 1993).

- Rôle de NO dans le système immunitaire:

Les premières études du NO ont surtout montré sa toxicité. On pensait autrefois que les nitrates excrétés par l'homme étaient uniquement d'origine alimentaire. Or l'équipe de Tannenbaum observa en 1981 que des individus et des rats qui consommaient peu de nitrates alimentaires en excrétaient néanmoins de grandes quantités. L'alimentation n'était donc pas la seule source de nitrates. En outre, un sujet atteint de diarrhée infectieuse excréta beaucoup de nitrates urinaires: la formation de ces nitrates semblait liée au processus inflammatoire. Plus récemment une équipe a observé que l'injection d'endotoxine bactérienne stimulait l'excrétion de nitrates chez le rat (Green et al., 1981; Snyder et Bredt, 1992).

En effet, NO intervient dans la défense antitumorale, en particulier dans les mécanismes de cytotoxicité médiés par les macrophages (Stuehr et Marletta, 1985; Hibbs et al., 1987a, b; Drapier et al., 1988; Stuehr et Nathan, 1989; Keller et al., 1990).

L'activation des macrophages péritonéaux murins, que se soit *in vivo* par des pathogènes à multiplication cellulaire tels que *Mycobacterium bovis*, ou *in vitro* par des cytokines en particulier l'interféron-gamma (l'IFN- $\gamma$ ), les rend cytotoxiques pour les cellules tumorales cibles, les mécanismes de cytotoxicité mis en jeu ne passant pas par des processus de phagocytose. Il a été démontré ensuite que ces macrophages activés expriment la iNOS et synthétisent du  $\text{NO}_3^-$  (Stuehr et Marletta, 1987a) et du  $\text{NO}_2^-$  en réponse à une stimulation par l'IFN- $\gamma$ , seul ou en combinaison avec le lipopolysaccharide (LPS) ou avec le tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Stuehr et Marletta 1987a,b; Ding et al., 1988). Ainsi, la cytotoxicité des macrophages activés contre des cellules tumorales a été établie (Hibbs et al., 1987b) comme dépendante de la concentration en L-arginine. Ces auteurs montrent aussi que les macrophages activés synthétisent la L-citrulline

et le  $\text{NO}_2^-$  à partir de l'arginine et que le L-NMMA inhibe la synthèse de ces deux produits ainsi que l'expression de la cytotoxicité (Hibbs et al., 1987b).

Le rôle de NO comme médiateur de la cytotoxicité a été initialement démontré (Hibbs et al., 1988), et la voie métabolique de la L-arginine a été considérée comme un mécanisme de défense important contre les microorganismes intra- et extracellulaires, parasites, bactéries, et champignons (Hibbs et al., 1990).

NO agit sur ces cibles en particulier en se liant aux centres fer-soufre des protéines (Drapier et al., 1991; Feldman et al., 1993). On note aussi qu'une perte massive de fer intracellulaire est une cause possible de la lyse des cellules tumorales induite par les macrophages activés. NO semble agir sur le site actif de différentes enzymes intervenant aussi bien dans la réplication de l'ADN (ribonucléotides réductase, RNR) (Lepoivre et al., 1990) que dans le cycle des acides citriques (aconitase) (Drapier et Hibbs, 1986) ou dans la respiration mitochondriale (complexes I et II de la chaîne de transport d'électrons) (Granger et Lehninger, 1982; Drapier et Hibbs, 1988). Des études par résonance paramagnétique électronique (RPE) ont montré que NO perturbe la configuration spatiale de structures fer-soufre de certaines enzymes, en formant des complexes fer-nitrosyle ( $\text{NO-Fe-SR}$ ), ce qui aurait pour effet d'inhiber l'activité enzymatique (Drapier et Hibbs, 1988; Lancaster, 1990; Pellat, 1990; Drapier, 1991). Ce phénomène intervient pour des quantités élevées de NO, produit pendant plusieurs heures. On note que la production de NO peut être aussi induite dans les cellules cibles elles-mêmes, par exemple, au moment d'une autodestruction des cellules tumorales, ou autotoxicité de bactérie (Heiss et al., 1994).

Dans le mécanisme d'action de l'effet anti-infectieux, il a aussi été démontré que NO pouvait réagir avec l'oxygène et produire différents toxiques tels que le

radical hydroxyl (OH) ou le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) (Stamler et al., 1992a). L'ion peroxydite, l'un des plus oxydants et des plus cytotoxiques des dérivés de NO, est maintenant proposé comme principal médiateur de l'activité cytotoxique de NO. Il interviendrait dans la nitration de résidus tyrosines de certaines protéines cellulaires (Beckman et al., 1994a). On sait également que certains composés S-nitrosylés (S-nitrosocystéine, S-nitrosoglutathion), et des thionitrites donneurs de NO, peuvent être puissamment microbicides, antiviraux ou anticancéreux (Maul, 1993; Roy et al., 1995)..

Il semble que NO ait été récemment identifié chez le rat et la souris comme un des médiateurs de l'immunosuppression due aux macrophages. Une concentration élevée en L-arginine intervient dans l'acquisition du caractère suppresseur (Albina, 1989a, b; Hoffman et al., 1990; Mills, 1991). De plus, l'addition de NMMA augmente la prolifération des lymphocytes (Mills, 1991; Nussler et al., 1995). Ce rôle immunomodulateur du NO a été confirmé par d'autres équipes, en utilisant l'Hb (Albina et Henry, 1991; Mills, 1991), ou l'anticorps monoclonal anti-IFN $\gamma$  dans des co-cultures cellulaires macrophages-cellules spléniques (Albina et al., 1991) afin d'induire la prolifération lymphocytaire. Le NO inhiberait préférentiellement la prolifération des lymphocytes Th1, et exercerait un rétrocontrôle de sa production.

Dans certaines trypanosomoses, où l'immunosuppression est très marquée, des macrophages exercent une puissante activité suppressive par des mécanismes faisant intervenir les prostaglandines et NO (Schleifer, et Mansfield, 1993).

#### - NO et Hémoprotéines :

Le NO se fixe à de nombreuses hémoprotéines (Fe II) *in vitro*. Il se fixe aussi parfois à leur forme ferrique (Henry et al., 1991). D'autre part, lorsqu'il est inhalé, NO est un gaz nocif du fait de sa liaison au fer

ferreux des hémoprotéines (Boucher et al., 1993; Rossaint et al., 1993). L'exemple le mieux connu est celui de l'hémoglobine. NO est capable de se fixer rapidement à la désoxyhémoglobine (Hb[FeII]), pour former le complexe Hb[FeII]NO relativement stable ( $t_{1/2} = 12\text{min}$ ). En effet, l'affinité de NO pour la désoxyhémoglobine est 106 fois supérieure à celle de l'oxygène. L'oxyhémoglobine (Hb[FeII]O<sub>2</sub>), quand à elle, peut être convertie par NO en méthémoglobine ( $t_{1/2} = 20\text{h}$ ) et en nitrate (Ducrocq et al., 1994).

Par ailleurs, l'hémoglobine pourrait jouer un rôle de transporteur ou d'oxydant de NO (Henry et al., 1991; Traylor et Sharma, 1992; Boucher et al., 1993). En fait, chez l'homme, chaque sous-unité de l'hémoglobine contient un groupement héminique, et les sous-unités  $\beta$  contiennent des résidus thiols très réactifs (Cys  $\beta$ 93), formant la S-nitrosohémoglobine. Cette forme nitrosylée de l'hémoglobine a été récemment identifiée non seulement comme facteur de régulation des activités vasculaire, pulmonaire et systémique, mais aussi comme un élément de transnitrosylation (Jia et al., 1996).

D'autres hémoprotéines sont activées par NO, telle que la guanylate cyclase où le récepteur de NO est l'atome de fer. La fixation de NO déforme le groupement hème (qui contient l'atome de fer), et active la production du second messager le GMPc à partir du GTP, ce qui induit une vasodilatation et une inhibition de l'agrégation plaquettaire (Ignarro, 1991; Moncada et al., 1991; Schrtidt, 1992; Snyder et Bredt, 1992). Citons aussi la prostaglandine H synthase (Salvemini et al., 1993; Stadler et al., 1993), et d'autres qui sont plus ou moins réversiblement inhibées (Rogers et Ignarro, 1992; Assreuy et al., 1993; Rengasamy et Johns, 1993), telles que les cytochromes P-450 (Adams et al., 1992; Ducrocq et al., 1994) et les NOS elles-mêmes (Rogers et Ignarro, 1992; Assreuy et al., 1993; Rengasamy et Johns, 1993).



En conclusion, NO se présente sous différentes formes de transport; les mécanismes enzymatiques de synthèse, stockage et de transport sont effectués en fonction de ses rôles d'intermédiaire et d'effecteur (Stamler et al., 1992a, 1994).

- NO et cancérogénèse :

Dans différentes situations, NO paraît exercer plusieurs rôles, parfois même antagonistes. Ceci est vrai en ce qui concerne la cancérogénèse (Calmels et Ohshima, 1995). En contraste avec son rôle dans les défenses de l'organisme (bactéricide et cytotoxique), NO est susceptible d'entraîner des altérations de l'ADN, favorisant ainsi le développement du cancer. Ceci cependant, a le plus souvent été mis en évidence dans des travaux *in vitro* souvent éloignés des conditions physiologiques.

Plusieurs rôles distincts de NO au niveau des différentes étapes de la cancérogénèse ont été observés:

(i) la formation de peroxy-nitrite, produit naturellement cytotoxique, qui après protonation, peut également se décomposer en OH et NO<sub>2</sub> (Beckman et al., 1990). Ces radicaux seraient en partie responsables de dommages oxydatifs à l'ADN permettant alors la transformation néoplastique ultérieure des cellules touchées;

(ii) la génotoxicité du NO et la déamination de l'ADN : NO peut induire des mutations dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes humaines (Nguyen et al., 1992);

(iii) la formation de nitrosamines: le NO après oxydation est susceptible de réagir avec un substrat nitrosable pour former des nitrosamines. Ces derniers sont de puissants cancérigènes chez l'animal et sont également suspectés à l'origine de certains cancers chez l'homme (Loser et al., 1989; Jacob et Belleville, 1991).

NO peut également favoriser l'évolution du cancer par le biais d'une immunosuppression (Hoffman et al., 1990; Albina et al., 1991; Mills, 1991). Des études ont montré par exemple que sa présence semble favoriser le processus de transformation néoplasique de fibroblastes murins *in vitro* (Werner-Felmayer et al., 1993). Cependant, de récents travaux indiquent un effet protecteur plus ou moins controversé de NO vis-à-vis de la cytotoxicité induite par les espèces oxygénées (Wink et al., 1993) et vis-à-vis de la progression de tumeurs de la peau induites sous W chez la souris (Yuin et al., 1993; Calmels et Ohshima, 1995). Enfin, malgré son rôle dans la cancérogénèse, NO est également un élément effecteur important vis-à-vis des cellules tumorales (Hibbs et al., 1990). De plus, NO peut également médier l'apoptose de différents types cellulaires (Sarih et al., 1993; Me, Bmer et al., 1994; Fehsel et al., 1995). Toutes ces données mettent en évidence les diverses influences de NO.

#### - NO et maladies inflammatoires autoimmunes :

Il a récemment été découvert que NO est impliqué dans certaines pathologies inflammatoires (Schmidt et Walter, 1994; Moilanen et Vapaatalo, 1995). Parmi celles-ci, la sclérose en plaques (SEP) (Sherman et al., 1992) et la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Grabowski et al., 1996) sont les plus étudiées.

Les Inventeurs se sont intéressés à ces deux dernières pathologies pour montrer l'effet de NO et de ses dérivés nitrés ou nitrosylés dans leur évolution clinique. Les études sont basées sur des modèles expérimentaux pour la SEP (l'encéphalite autoimmune expérimentale) et pour la PR (l'arthrite inflammatoire expérimentale).

Les mécanismes d'action du NO, direct ou par l'intermédiaire de dérivés, sont encore mal connus. Du fait de sa nature, NO peut diffuser à travers les membranes des cellules avoisinant celles où il a été synthétisé. Cette diffusion de NO peut expliquer un effet

locale à très courte distance du fait de sa grande réactivité. C'est probablement ce mécanisme qui entraîne l'activation de la guanylate cyclase des cellules musculaires lisses des vaisseaux par le NO synthétisé par les cellules endothéliales. Cependant, une action à distance du NO peut également être envisagée. Cette action à distance peut être liée à l'existence de molécules capables de fixer le NO puis de le relarguer. Parmi les composés susceptibles de jouer ce rôle, les composés S-nitrosothiols jouent un rôle participant important. Ainsi des S-nitrosothiols ont été mis en évidence dans les phénomènes de vasodilatation dès 1981 (Ignarro et al.).

Plus récemment des nitrosothiols ont été également mis en évidence au niveau des cellules de système immunitaire (Dias-Da-Motta et al., 1996 ; Wagner et al., 1996; Zhao et al., 1996). Les mécanismes de libération de NO par ces molécules sont mal connus et en particulier les réactions conduisant au passage du NO sur d'autres molécules. De plus, s'agit-il toujours de la forme NO ou les formes  $\text{NO}^+$  peuvent elles être impliquées dans des mécanismes de nitrosylation ? Peut-il également y avoir intervention d'autres radicaux en particulier les dérivés de  $\text{l'O}_2$  ? Quelque soient les modes d'action du NO localement ou à distance, il peut donc exister des molécules intermédiaires douées des propriétés et de stabilité plus grande que le NO dont la fonction n'est pas encore connue.

Les anticorps de l'invention ont permis dans un premier temps d'étudier la stabilité et les propriétés de composés nitrosylés, puis ils ont été utilisés pour masquer des épitopes nitrosylés qui apparaissent dans certains états pathologiques où une surproduction de NO a été objectivée. Une production élevée de ces dérivés nitrosylés pourrait être responsable, au moins en partie, des troubles observés.

## II- PRÉPARATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX DIRIGÉS CONTRE DES CONJUGUÉS NITROSYLÉS.

### 1) La réponse immunitaire.

5           La destruction des agents infectieux est  
produite par un ensemble d'éléments appartenant au système  
immunitaire. Cette protection est obtenue grâce à une  
réponse immunitaire de type humoral et/ou cellulaire dont  
les acteurs indispensables sont les cellules  
10 lymphocytaires et macrophagiques (Oberg et al., 1993). Les  
lymphocytes B favorisent la réponse humorale via la  
production d'anticorps reconnaissant spécifiquement un  
antigène donné, s'accompagnant dans certains cas de la  
neutralisation de l'effet nocif de ce dernier. Les  
15 lymphocytes T helper (Th1) interviennent dans l'activation  
des macrophages en sécrétant des cytokines telles que  
l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha/\beta$ . Les macrophages activés libèrent  
différentes molécules dites effectrices qui exercent un  
effet cytostatique ou cytotoxique vis-à-vis des  
20 microorganismes intra- ou extracellulaires. Parmi ces  
molécules, on trouve des radicaux libres et en particulier  
le NO (Liew, 1991; Ahvazi et al., 1995; Blasi et al. 1995;  
Juretic et al., 1995; Lin et al. 1995) qui, en se fixant  
sur des cibles moléculaires, génère *in vivo* des  
25 néoantigènes nitrosylés pouvant induire une réponse  
humorale.

Pour reproduire au mieux la structure de ces  
néoantigènes, les Inventeurs ont synthétisé des conjugués  
artificiels par couplage de NO à deux acides aminés, la  
30 tyrosine et la cystéine. A l'aide de ces conjugués, ils  
ont induit des anticorps polyclonaux dirigés contre des  
épitopes NO-Tyr et NO-Cys chez le lapin.

### 2) L'immunochimie des haptènes.

35           L'immunochimie des petites molécules ou  
haptènes, est basée sur la reconnaissance spécifique d'un  
antigène particulier par un anticorps (Ac), et ce de façon

hautement sélective (Landsteiner, 1945; Kabat, 1968; Goodman, 1975). Les haptènes tels que les acides aminés (cystéine, tyrosine, tryptophane,...) ont un faible poids moléculaire (75-300 daltons) et ne sont donc pas immunogéniques par eux-mêmes. Le développement d'Ac spécifiques repose sur un certain nombre de principes méthodologiques et de concepts. Ainsi :

- une substance est immunogénique lorsqu'elle possède la capacité de stimuler la production d'Ac; sa taille doit être supérieure à 1000 daltons.

- un composé est antigénique lorsqu'il entre en interaction spécifique avec un site Ac. Pour cela, celui-ci doit discriminer des conjugués structuralement proches, différents par la position d'un groupement chimique sur l'haptène (Landsteiner, 1945; Geffard et al., 1985a);

- la liaison antigène-Ac s'établit grâce à des liaisons de différents types: hydrogène, Van Der Waals, ionique, hydrophobe.

Pour réaliser cette approche, les Inventeurs ont dans un premier temps synthétisé des conjugués nitrosylés, puis des conjugués possédant une analogie structurale avec les premiers. L'étude a porté exclusivement sur des conjugués nitrosylés et leurs correspondants non nitrosylés ainsi que des conjugués nitrés. A l'aide de ces outils, il a été produit et caractérisé des Ac polyclonaux anti-haptènes nitrosylés couplés à des protéines porteuses en utilisant la carbodiimide comme agent couplant.

### 3) Materiel et methodes.

a) Synthèse des immunogènes NO-tyrosine et NO-cystéine couplés à une protéine porteuse par un couplage type "carbodiimide":

La synthèse des immunogènes est réalisée dans un premier temps par le couplage de l'haptène L-tyrosine (Tyr) ou L-cystéine-N-acétylée (Cys) à une protéine

porteuse telles que la sérum albumine bovine (SAB) ou la sérum albumine humaine (SAH) par la carbodiimide selon le procédé indiqué ci-dessous (Harlow et Lane, 1988). Dans un second temps les conjugués obtenus sont nitrosylés par un

5

10 mg de Tyr (Fluka), ou 20 mg de Cys (Sigma), sont solubilisés dans le tampon MES (2 [N-Morpholino] ethanesulfonic acid, Sigma) (0,2 M) pH 5,4, puis un microlitre d'isotope radioactif [ $^3\text{H}$ -Tyr] (NEN, activité

10 spécifique: 31,0 ci/mmmole) est ajouté. Ensuite, 20 mg de SAB ou SAH dissous dans le même tampon MES sont alors ajoutés pour conjuguer l'haptène par une liaison amide. L'activation du groupement carboxylique de la Tyr ou de la

15 Cys est initiée par l'addition de la carbodiimide [1-ethyl-3 (3-diméthylamino propyl) carbodiimide, Sigma]. Les molécules de Tyr et de Cys non liées sont éliminées par dialyse contre l'eau distillée pendant 24 heures (h) à 4 C.

15

20

. Le marqueur radioactif permet de déterminer la concentration en haptène conjugué comme suit:

Concentration (M) en haptène couplé =  $X \text{ mg hap} \times \text{CPM après} / \text{CPM avant} \times \text{Vol av} \times \text{PM hap}$

25

où X mg est la quantité d'haptène utilisée pour faire le couplage; CPM av est la radioactivité avant dialyse; CPM après est la radioactivité après dialyse; Vol av est le volume avant dialyse; PM hap est le poids moléculaire de l'haptène.

30

. Pour calculer la concentration en protéine selon la loi de Beer-Lambert  $\text{DO} = \epsilon \times c \times l$  (dans ce travail longueur de la cuve  $l = 1 \text{ cm}$ ), l'absorbance à des longueurs d'onde 280 nm et 300 nm a été utilisée (Geffard et al., 1985a):

Concentration (M) en protéine =  $\text{DO } 280 \text{ nm} - \text{DO } 300 \text{ nm} / \epsilon \text{ protéine}$

35

où  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire de la protéine à 280 nm; il est de 34 500 pour la SAB et la SAH;

Pour les haptènes qui absorbent à 280 nm (Tyrosine, Tryptophane), les Inventeurs ont utilisé, pour déterminer la concentration de la protéine la formule suivante :

$$D_{280} = C_{hap} \times \epsilon_{hap} + C_{protéine} \times \epsilon_{protéine}$$

. Le rapport de couplage est le nombre de moles d'haptène couplé par une mole de protéine:

$$\text{Rapport (R)} = \frac{\text{concentration en haptène}}{\text{concentration en protéine}}$$

. Le poids en conjugué est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$\text{Poids du conjugué} = [(R \times PM_{hap}) + PM_{prot}] \times \text{conc protéine}$$

où la concentration (conc) est exprimée en M. Le poids est en mg/ml.

#### - Nitrosylation des conjugués néosynthétisés :

La nitrosylation se fait en utilisant un donneur chimique de NO, le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) en milieu acide (Stamler et al., 1992d). Ainsi, la formation de la liaison NO-haptène a été évaluée par spectrophotométrie en mesurant les DO entre 320 et 500 nm. De plus, la S-nitrosylation a été prouvée par la méthode de (1958) en utilisant le chlorure de mercure  $\text{HgCl}_2$ . En effet, le  $\text{HgCl}_2$  en présence du composé S-nitrosylé entraîne une libération immédiate de l'azote lié au soufre du résidu nitrosothiol. Cet hydrolyse rapide peut être expliquer par l'affinité des ions  $\text{Hg}^{2+}$  pour le soufre.

Le tableau 1 ci-dessous montre la structure des deux haptènes nitrosylés liés à la protéine porteuse SAB.

Tableau 1

Conjugués	Structures moléculaires
Tyrosine -SAB	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{CO} - \text{NH} - \text{BSA}$
NO-Tyrosine-SAB	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}) - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{CO} - \text{NH} - \text{BSA}$
Cystéine-acétylée-SAB	$\text{SH} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH} - \text{CO} - \text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{CO} - \text{NH} - \text{BSA}$
NO-Cystéine-acétylée-SAB	$\text{NO} - \text{S} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH} - \text{CO} - \text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{CO} - \text{NH} - \text{BSA}$

b) Synthèse d'autres conjugués nitrosylés et nitrés :

L'utilisation de différents agents couplants tels que la carbodiimide, le glutaraldéhyde (G) ou l'anhydride succinique (AS), permet d'obtenir des épitopes de conformation distincte.

- Type "carbodiimide" :

Synthèse de NO-Tryptophane-SAB : La carbodiimide, le tryptophane (Tryp, Sigma) et la SAB ont été utilisés pour la synthèse du conjugué Tryp-SAB. Ce conjugué a donc été ensuite nitrosylé en utilisant le  $\text{NaNO}_2$ .

- Type "glutaraldéhyde" :

Synthèse de NO-Tyr-G-SAB, NO-Cys-G-SAB, et NO-Tryp-G-SAB: 5 mg de chaque haptène: Tyr, Cys (non acétylée) ou Tryp ont été dissous dans du tampon acétate (1,5 M), pH 8,3. Pour suivre la réaction de couplage, une faible quantité d'haptène tritié est ajoutée. Puis une solution aqueuse de glutaraldéhyde (G) 5% (Merck) est mélangée à la solution hapténique. Au bout de quelques secondes, la protéine (10 mg) diluée dans le même tampon est mélangée à la solution hapténique jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune. La réaction est ensuite arrêtée



par l'addition de 200 µl d'une solution de NaBH<sub>4</sub> (10 mM); quand le mélange est devenu translucide, chaque solution des différents conjugués est mise à dialyser contre de l'eau distillée 24 h à 4°C (Atassi, 1984).

5

- Type "anhydride succinique" :

. Synthèses de NO-Tyr-AS-SAB et NO-Cys-AS-SAB : 20 mg de Tyr ou de Cys (non acétylée) sont repris dans 200 µl de Diméthyl-sulfoxyde (DMSO, Merck) et 800 µl d'eau distillée. La succinylation s'effectue en additionnant 17 mg d'anhydride succinique (AS) (Sigma), puis une quantité de NaOH 1N est ajoutée pour neutraliser le mélange. Il est ensuite mis à lyophiliser.

5 mg d'haptène succinylé sont dissous dans 1 ml de diméthylformamide (DMF, Merck) pure anhydre, contenant 50 µl du triéthyl-amine (TEA, Merck) pure, anhydre. On active les groupements COOH libres de l'haptène succinylé en ajoutant 200 µl d'Ethyl chloroformate (ECF, Prolabo) prédilué au 1/6. Puis, la solution contenant 10 mg de SAB est ajoutée. Le mélange réactionnel est dialysé contre de l'eau distillée pendant 24 h à 4°C sous agitation.

La méthode de nitrosylation des deux types de couplage (G et AS) est identique à celle décrite plus haut pour le couplage de type carbodiimide.

. Synthèse de NO<sub>2</sub>-tyrosine-SAB : La synthèse de ce conjugué nécessite 20 mg de l'haptène NO<sub>2</sub>-Tyr (Sigma) et 20 mg de SAB. Le couplage est effectué en utilisant la carbodiimide selon le même protocole décrit ci-dessus.

. Synthèse de conjugués NO-protéines : Cette forme de la SAB nitrosylée ou S-nitroso-SAB a été préparée à partir de la SAB et de nitrite de sodium. Une même quantité de protéine et de NaNO<sub>2</sub> est pesée pour faire le couplage NOSAB selon la méthode de Stamler (1992d).

35

c) Obtention et caractérisation d'Ac polyclonaux anti-NO conjugué :

- Immunisation des lapins :

A partir des conjugués NO-Tyr et NO-Cys, les Inventeurs ont immunisé par voie sous cutanée (Vaitukaitis et al., 1971) des lapins: le lapin "T" par les conjugués NO-Tyr-protéine (SAB ou SAH), et le lapin "C" par les conjugués NO-Cys-protéine. L'immunisation a été faite en alternant ces deux protéines porteuses (Geffard et al., 1984a, b; 1985a). L'immunisation a été effectuée en injectant une émulsion contenant 200 µg du conjugué, d'adjuvant complet de Freund (ACF, DIFCO) et du tampon phosphate salin (TPS). Le prélèvement des antisérums a été fait entre 12-21 jours après chaque injection.

- Purification des immunoglobulines :

Une réponse immune a été induite. Pour enrichir les sérums en immunoglobulines (Ig) spécifiquement dirigées contre les haptènes couplés, les méthodes de purification suivantes ont été utilisées:

. Adsorption des sérums polyclonaux sur les protéines porteuses :

Les sérums polyclonaux ont été adsorbés sur les conjugués non nitrosylés correspondants: Tyr-SAB/SAH pour le lapin "T" et Cys-SAB/SAH pour le lapin "C". (Geffard et al., 1984a; Geffard et al., 1985b; Campistron et al., 1986). L'adsorption a été faite dans les proportions de 5 mg de conjugué par ml de sérum natif. Le mélange a été incubé 16 h à 4°C sous agitation et les immunoprécipités ont été éliminés par centrifugation 15 minutes à 10 000g. Le surnageant est enrichi en Ig spécifiques, alors que le culot contient les complexes immuns protéines porteuses-Ig de lapin.

. Purification des Ig par précipitation au sulfate d'ammonium :

A un volume de sérum polyclonal de lapin, est ajouté un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Le mélange est incubé 1 h à 4°C, puis centrifugé 15 minutes à 10 000g. Le culot (contenant les Ig précipitées) est repris dans un volume minimum de

tampon TPS puis dialysé pendant 3 jours contre du tampon TPS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,01 M, NaCl 0,15 M).

. Purification des Ig par chromatographie d'exclusion :

5                   Après précipitation au sulfate d'ammonium, les Ig ont été séparées selon leur poids moléculaire (PM) par la technique de chromatographie d'exclusion sur colonne G 200 (Séphadex) (Mons et Geffard, 1987). La détermination de la concentration en Ig a été déduite de l'analyse spectrophotométrique d'un aliquot dilué, elle a ensuite  
10                   été estimée de la manière suivante:

1,4 unité de DO à 280 nm correspond à une quantité de 1 mg/ml d'Ig.

15                   Les Ig spécifiques sont principalement des Ig G. les surnageants purifiés selon une de ces méthodes ont été utilisés pour étudier le titre, l'avidité et la spécificité en utilisant le test ELISA.

d) Test immunoenzymatique (méthode ELISA) :

20                   Quatre grandes étapes sont nécessaires pour la réalisation du test immunoenzymatique (Engvall et al., 1972):

25                   1ère étape : Revêtement des plaques de microtitration. C'est l'étape d'adsorption des conjugués: NO-Tyr-SAB et Tyr SAB pour le lapin "T" ou NO-Cys-SAB et Cys-SAB pour le lapin "C", dans des puits de plaques de microtitration (Maxisorp certifiées, NUNC). Cette étape de revêtement a été faite également avec les conjugués couplés "G", "AS" et pour la SAB et NO-SAB.

30                   2ème étape : La saturation. Il est nécessaire de "saturer" les puits, pour éviter l'accrochage non spécifique. Cette étape se fait avec le tampon suivant: TPS-tween-glycérol-SAB. Tween 0,05 % pH = 7,2, glycérol 10%. La concentration en SAB a été optimisée à 5 g/l.

35                   3ème étape : Formation des complexes primaires. Elle correspond à la fixation des Ac primaires potentiellement contenus dans le sérum à tester à une

dilution optimale de 1/20 000 (pour le lapin "T" et "C") sur les conjugués déposés au fond des puits.

5        4ème étape : Formation des complexes secondaires. Elle correspond à l'addition des Ac secondaires de chèvre anti-Ig de lapin (Diagnostic Pasteur) marqués à la peroxydase dilués au 1/8000 dans le tampon TPS-Tween-SAB.

10        5ème étape : Visualisation des complexes secondaires. Elle se fait par l'utilisation du substrat spécifique de la peroxydase ( $H_2O_2$ , Prolabo), en présence d'un chromogène, l'orthophénylène diamine (OPD, Sigma). La visualisation est réalisée par l'oxydation de l'OPD qui passe de l'état réduit incolore à l'état oxydé jaune. La réaction est ensuite stoppée par addition d'une solution  
15 d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ , 4N) dans chaque puits. Les DO sont lues à 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre multiscan informatisé (EL 312e, Bio-Tek Instruments). La valeur expérimentale obtenue est celle mesurée sur les puits ayant le conjugué (haptène-nitrosylé-protéine) ou  
20 protéine nitrosylée soustraite de celle lue sur les puits contrôles contenant le conjugué non nitrosylé ou de la SAB.

25        - Caractérisation immunochimique des sites Ac :  
Elle est basée sur deux propriétés des Ac : l'avidité et la spécificité :

30        . L'avidité de chaque antisérum a été appréciée comme suit : Des dilutions de conjugués NO-Tyr-SAB pour l'antisérum anti NO-Tyr ou NO-Cys-SAB pour l'antisérum anti NO-Cys, allant de  $2 \times 10^{-5}$  M à  $2 \times 10^{-12}$  M dans le TPS-Tween-SAB glycérol ont été préparées. Ces compétitions sont faites par incubation de l'Antisérum ("T" ou "C") en présence de l'immunogène pendant une nuit à 4°C. Le test se déroule ensuite comme décrit plus haut en utilisant ces  
35 dilutions comme des Ac primaires.

. Pour la spécificité: les composés utilisés pour les expériences de compétition sont les suivants pour

les deux types d'Ac: NO-Tyr-SAB; Tyr-SAB; NO-Cys-SAB; Cys-SAB; NO-Cys(non acétylée)-SAB; Cys(non acétylée)-SAB; NO-Tyr-G-SAB; Tyr-G-SAB; NO-Cys-G-SAB; Cys-G-SAB; NO-Tyr-SA-SAB; Tyr-SASAB; NO-Cys-SA-SAB; Cys-SA-SAB; NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB; NO-Tryp-SAB; Tryp-SAB; NO-Tryp-G-SAB; Tryp-G-SAB; NO-SAB.

A l'issue des compétitions, des courbes de déplacement pour les différents composés testés ont été établies.

#### 4) Résultats.

##### a) Analyse des conjugués nitrosylés :

##### - Analyse spectrophotométrique des conjugués:

Une étude spectrophotométrique a été utilisée pour suivre les différentes étapes de la synthèse des immunogènes. Celle-ci est faite entre les longueurs d'onde 240 et 500 nm. Par comparaison des spectres obtenus avant et après nitrosylation, les Inventeurs ont déterminé la zone d'absorbance de NO lié. Comme montré respectivement sur les courbe des figures 1 et 2, la zone d'absorbance de NO-Tyr-SAB a été observée entre 320 et 440 nm (figure 1) et celle de NO-Cys-SAB a été détectée entre 320 et 400 nm (figure 2). Une absence d'absorbance entre les longueurs d'onde 320 et 500 nm a été remarquée dans les spectres des conjugués: Tyr-SAB et le Cys-SAB;

La bande d'absorbance du même conjugué NO-Cys-SAB n'a pas été trouvée après le traitement de ce dernier avec une solution de 1mM de HgCl<sub>2</sub>. Ceci montre que la liaison covalente "S-NO" a été abolie.

##### b) Analyse immunochimique des sites Ac.

##### - Evaluation du titre en Ac dirigés contre les épitopes NO-Tyr et NO-Cys :

Pour le lapin "T" immunisé avec la NO-Tyr conjuguée, le titre en Ac spécifiques a évolué après chaque immunisation et la réponse optimale a été obtenue après la troisième immunisation. Ainsi, comme montré par

la courbe de la figure 3, deux types de réponses sont visualisées pour les lapins "T". La première correspond à une réponse dirigée contre le conjugué NO-Tyr-SAB qui est restée au cours de l'immunisation plus importante que la  
 5 deuxième qui est dirigée contre le conjugué Tyr-SAB. Sur la figure 3, la flèche blanche indique le prélèvement avant immunisation et les flèches noires indiquent les jours des prélèvements après chaque immunisation.

Pour le lapin "C" immunisé par la NO-Cys conjuguée, aucune réponse spécifique, n'a été obtenue  
 10 avant la 5ème immunisation. Avant cette immunisation, les Inventeurs ont observé une augmentation plus importante de la réponse anti-Cys-SAB par rapport à l'anti-NO-Cys-SAB. En revanche suite à la 5ème immunisation les Inventeurs  
 15 ont détecté une chute de la réponse non spécifique. La figure 4 montre l'évolution des deux types de réponse chez ce lapin : celle correspondant à une réponse sur le conjugué NO-Cys-SAB qui est une réponse globale comprenant les anticorps dirigés contre la protéine porteuse et une  
 20 deuxième dirigée contre le conjugué Cys-SAB. Sur la figure 4, la flèche blanche indique le prélèvement avant immunisation et les flèches noires indiquent les jours des prélèvements après chaque immunisation.

Le prélèvement du lapin "T" après la 3ème  
 25 immunisation a servi pour la caractérisation immunochimique des Ac spécifiquement dirigés contre l'épitope nitrosylé. De même, les Inventeurs ont utilisé le prélèvement après la 5ème immunisation pour le lapin "C".

30

- Détermination de l'avidité et de la spécificité des Ac développés :

L'avidité des Ac anti-NO-Tyr conjuguée et anti-NO-Cys conjuguée a été faite par des tests de  
 35 compétition. Une inhibition de la liaison des anti-sérums "T" et "C" a été obtenue en incubant chacun de ces deux Ac avec le conjugué nitrosylé qui a servi d'immunogène.

La diminution de la DO (B) indique la présence de compétition entre l'haptène conjugué qui est adsorbé sur la plaque de microtitration et l'haptène préincubé avec l'antisérum correspondant. Bo est la DO correspondant à la réponse obtenue avec l'antisérum en l'absence du compétiteur. Une dilution de l'antisérum (1/20 000) donnant une DO d'environ 1,0 à 492 nm a été choisie pour l'ajustement de la valeur de Bo; le rapport B/Bo a été utilisé pour tracer les courbes de compétition de la figure 5 obtenues avec les compétiteurs.

- Pour le lapin "T", l'avidité déterminée au demi-déplacement est de  $1,1 \times 10^{-8}$  M (figure 1, courbe 1) et pour le lapin "C", l'avidité est de  $4,5 \times 10^{-8}$  M.

La spécificité de chaque antisérum a été également évaluée par des expériences de compétition entre le conjugué NO-Tyr-SAB (pour l'antisérum "T"), ou NO-Cys-SAB (pour l'antisérum "C") et les analogues structuraux conjugués. Les courbes de déplacement ont été obtenues à partir des résultats des tests de compétitions avec les haptènes conjugués et qui n'ont pas été utilisés dans l'immunisation. En utilisant le rapport B/Bo pour chacun des compétiteurs, les Inventeurs ont pu déterminer les spécificités correspondantes :

. pour le lapin "T" le conjugué le mieux reconnu est l'immunogène qui a donné une avidité de  $1,1 \times 10^{-8}$  M. Les autres conjugués reconnus sont les suivants: le NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB (IC<sub>50</sub> =  $1,4 \times 10^{-7}$  M); NO-Tyr-SA-SAB (IC<sub>50</sub> =  $5 \times 10^{-5}$  M); et le NO-Tryp-G-SAB (IC<sub>50</sub> =  $3 \times 10^{-6}$  M). La courbe 2 de la figure 5 montre aussi l'absence de la reconnaissance du Tyr-SAB par cet antisérum.

- Pour le lapin "C" l'immunogène NO-Cys-SAB et le conjugué NO-Cys(non acétylée)-SAB ont été reconnus avec une avidité de  $4,5 \times 10^{-8}$  M et une spécificité de  $\sim 10^{-6}$  M.

Tous les autres conjugués, nitrosylés (par exemple la NO-SAB) ou non, ne sont pas reconnus par l'Ac "T" ou l'Ac "C".

(IC<sub>50</sub> est la concentration molaire du compétiteur donnant 50 % d'inhibition).

Il convient aussi de remarquer que, des tests ELISA indirects ont montré une discrimination entre la NO-SAB et la SAB par les Ac polyclonaux "T" et "C". Les DO  
5 obtenues avec ces antisérums sont respectivement de l'ordre de  $0,34 \pm 0,062$  et  $0,27 \pm 0,05$ . En revanche, en phase liquide, la NO-SAB n'a pas été reconnue ce qui pourrait être expliqué par la modification  
10 conformationnelle de cette molécules en phase solide (test indirect) et phase liquide (test de compétition).

#### 5) Discussion.

En se basant sur les travaux de Landsteiner,  
15 (1945); Goodman, (1975); Geffard et al., (1985b); et Mons et Geffard, (1987) pour l'induction des antisérums contre des petites molécules, le développement d'Ac anti-NO-conjugué a été réalisé. La réactivité de NO avec les groupements thiols pourrait expliquer, en partie, son  
20 intervention dans différents processus biologiques (Girard et Potier, 1993). En fait, il a été postulé que NO est stabilisé sous forme de S-nitrosothiol qui peut conserver sa réactivité biologique. La présente étude immunologique est basée sur l'hypothèse de la stabilité des dérivés-NO.  
25 Les Inventeurs ont utilisé différents conjugués nitrosylés présumés transporteurs de NO (résidus aryls nitrosylés et S-nitroso-Cys). La caractérisation immunochimique des anti-NO-Tyr et anti-NO-Cys développés montre un pouvoir de discrimination différent de ces Ac pour les immunogènes  
30 correspondants. De plus, le titre spécifique optimal anti-Tyr nitrosylée a été observé après la 3ème immunisation, au bout de 1-2 mois (figure 3), alors que l'anti-Cys nitrosylée, ne présente pas d'évolution du titre avant une période de 2-3 mois (figure 4), et donne  
35 un titre optimal après la 5ème immunisation.

En ce qui concerne la spécificité de ces Ac préincubés avec d'autres conjugués présentant une analogie



structurale avec le composé utilisé comme immunogène, on note également une différence dans les réponses obtenues avec ces deux Ac. Ainsi, l'Ac "T" reconnaît deux conjugués qui n'ont pas été utilisés dans l'immunisation, le NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB et le NO-Tryp-SAB, ce qui n'est pas le cas de l'Ac "C". Aucun des autres conjugués non nitrosylés n'a été reconnu par ces deux Ac. Les réponses différentes observées avec ces deux types d'Ac pourraient également être expliquées par les différences de structures moléculaires des immunogènes, leur stabilité dans le milieu biologique, leur métabolisme, ou bien par les modifications favorisées par les cellules présentatrices de l'antigène. Tous ces facteurs peuvent jouer un rôle fondamental dans la stimulation du système immunitaire et dans l'avidité de l'Ac induit.

Enfin, la reconnaissance de la NO-SAB synthétisée chimiquement par les Anticorps polyclonaux, ont amené les Inventeurs à utiliser cette forme de transport de NO dans des multiples applications *in vitro*, en utilisant les macrophages activés comme donneurs biologiques de NO.

### III - DÉTECTION ET NEUTRALISATION DE DÉRIVÉS DE NO PAR LES ANTICORPS POLYCLONAUX.

Les cellules macrophagiques jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. En effet, dès l'apparition d'une infection, elles peuvent intervenir dans la destruction du microorganisme, en le phagocytant. De plus, les macrophages activés lors d'une réponse immunitaire spécifique exercent un effet microbicide cytotoxique sur des microorganismes intracellulaires (Ruskin et Remington, 1968). Une des voies métaboliques de l'arginine est essentielle dans l'activation des macrophages et dans leur effet cytotoxique sur des cellules tumorales (Hibbs et al., 1987a) et cytostatique sur des espèces fongiques telle que *Cryptosoccus*

5 *neoformans* (Granger et al., 1988). Cette voie métabolique conduit à la synthèse de la L-citrulline et de NO à partir de l'arginine (Hibbs et al., 1987b; Hibbs et al., 1988), grâce à la iNOS. L'analogue structural de l'arginine, NMMA a ensuite été caractérisé comme inhibiteur compétitif de cette synthèse à partir des macrophages activés (Hibbs et al., 1987a, b; Drapier et Hibbs 1988; Hibbs et al., 1988).

10 Ce phénomène de cytotoxicité a été étudié essentiellement *in vitro* dans les macrophages murins et il existe maintenant un large consensus pour affirmer que la voie de biosynthèse L-arginine → NO en est la base (Drapier, 1993).

15 Le rôle cytotoxique de NO a également été interprété comme résultat de la formation de complexes fer-nitrosyls au niveau des enzymes du métabolisme oxydatif des cellules cibles (Stuehr et Nathan 1989; Stuehr et al., 1989).

20 En conclusion, une infection induit une stimulation des lymphocytes T via la présentation de l'antigène. Les cellules T sécrètent l'IFN- $\gamma$  en réponse à leur activation et une stimulation successive se maintient donc avec la présence persistante de l'antigène ou d'une réinfection. L'IFN- $\gamma$  active alors les macrophages qui produisent d'autres cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1
   
 25 qui, en synergie avec L'IFN- $\gamma$  peuvent stimuler les macrophages. L'activation macrophagique permet l'élimination de certaines cellules tumorales et de nombreux agents pathogènes. Parmi les différents mécanismes élaborés par les macrophages, un des plus
   
 30 efficaces est la synthèse de NO. La destruction des leishmanies et des schistosomes peut être complètement inhibée par le NMMA (James et Glaven, 1989; Green et al., 1990; Liew et al., 1990). Ceci semble indiquer que dans ces cas NO est nécessaire, et pourrait même être
   
 35 suffisant, pour expliquer le rôle microbicide des macrophages. NO est donc un élément indispensable de la défense de l'organisme.

Les travaux rapportés ci-après vise à mettre en évidence la forme sous laquelle NO est transporté pour agir au niveau de ses cibles. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques, les Inventeurs ont utilisé une source biologique de NO (macrophages activés par le BCG), la SAB comme transporteur de NO et des trypanosomes extracellulaires. L'objectif est de détecter des épitopes nitrosylés formés *in vitro* possédant un rôle cytotoxique et d'obtenir leur blocage en utilisant nos anticorps polyclonaux anti-NO-Tyr et anti-NO-Cys conjuguées.

1) Matériel et méthodes.

a) Prélèvement et culture des macrophages :

Des macrophages péritonéaux provenant de souris Swiss préalablement infectées avec le BCG (Institut Pasteur) ou des macrophages normaux; ont été mis en culture à  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml/boîte de Pétri, pendant 8 h à 37°C dans une étuve contenant 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture utilisé est le HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO). La culture a été effectuée en présence ou non de NMMA à 0,5 mM.

b) Détection de la formation des conjugués-NO et de NO-SAB par le test ELISA :

- Tests de compétition entre le conjugué nitrosylé formé dans le milieu de culture et les conjugués NO-Tyr-SAB ou NO-Cys-SAB néosynthétisés :

Les surnageants provenant des milieux de culture de macrophages activés contenant les conjugués nitrosylés (NO-Tyr-SAB ou NO-Cys-SAB), ont été incubés en présence de l'antisérum "T" ou "C" utilisés à 1/20 000. Ces conjugués nitrosylés ont été formés à partir de NO produit par les macrophages et les conjugués Tyr-SAB ou Cys-SAB ajoutés dans le milieu. Après incubation ces surnageants ont ensuite servi comme Ac primaires pour le test ELISA. Ce dernier a été réalisé sur des plaques de microtitration

adsorbées par les conjugués NO-Tyr-SAB ou NO-Cys-SAB. Le reste du test est identique à celui décrit précédemment.

Le même protocole a été utilisé pour le surnageant provenant de milieux de culture de macrophages normaux (contrôle). Pour ce travail, 5 expériences ont été faites et une bonne reproductibilité a été obtenue avec l'anti-NO-Cys.

- Détection de la nitrosylation des épitopes portés par la SAB en utilisant les Ac anti-NO-Tyr et anti-NO-Cys:

Cette application a nécessité l'utilisation de la SAB délipidée (4 mg/ml), pour éviter la lipopéroxydation ( $\text{NO} + \text{O}_2^-$ ) des acides gras adsorbés sur la SAB. Cette lipopéroxydation donne des composés entraînant des réactions non spécifiques. La protéine a été ajoutée dans le milieu de culture (HBSS) des macrophages activés ou non pendant 8 h. Les plaques de microtitration ont ensuite été adsorbées pendant 6 h par les surnageants provenant des milieux de culture des macrophages activés (contenant NO-SAB), des macrophages non activés ou du milieu de culture seul. Après saturation les Ac primaires "T" ou "C" ont été utilisés à la dilution de 1/1000.

- Neutralisation de l'effet trypanostatique de NO-SAB :

La souche Partinico II de *T. musculi* a été utilisée. Les trypanosomes ont été purifiés par passage sur colonne de diéthyl aminoéthyl cellulose (Lanham, 1968). Les trypanosomes ont été ensuite co-cultivés pendant 8 h en présence des macrophages de souris normales ou infestées par le BCG en milieu RPMI contenant la SAB délipidée (4 mg/ml). Les Ac polyclonaux (1/100) ou le NMMA (0,5 mM) ont été ajoutés dans quelques puits pour pouvoir comparer leurs effets inhibiteurs. Le sérum de lapin normal et un Ac polyclonal anti-SAB ont été utilisés comme contrôle à la même dilution que les antisérums "T" et "C".

. Neutralisation du transfert de cet effet trypanostatique :

L'objectif de ce travail a été de confirmer l'effet trypanostatique de NO-SAB. Pour cela, le surnageant de cultures contenant de la SAB et des macrophages activés par le BCG en présence ou non de NMMA, est transféré après 8 h d'incubation, sur une co-culture de macrophages normaux /*T. musculi* selon les mêmes conditions. Les Ac polyclonaux "T", "C", le sérum de lapin normal ou l'anti SAB dilués au 1/100 sont appliqués avec le surnageant.

Par ces deux méthodes, les Inventeurs ont dans un premier temps, étudié l'effet cytotatique trypanostatique de la NO-SAB soit direct soit transféré. Dans un second temps, ils ont comparé la neutralisation de cet effet par les Ac polyclonaux selon deux procédés légèrement différents. Le fait d'inhiber l'effet trypanostatique par ces Ac selon ces deux conditions prouve d'une part la synthèse de NO et donc la formation de la NO-SAB et, d'autre part que c'est un effet à priori propre à la NO-SAB et non pas à d'autres dérivés oxygénés.

. Mesure de la quantité de nitrite produit :

La production de NO est donnée par la formation du  $\text{NO}_2^-$  accumulé dans le milieu de culture en utilisant une réaction colorimétrique : la méthode de Griess (Hageman et Reed, 1980; Lepoivre et al., 1989). Le réactif de Griess photosensible est obtenu en mélangeant volume à volume sulfanilamide (1% dans HCl 1,2 N; Sigma) et N-(1-naphtyl) éthylènediamine dihydrochlorate (3% dans l'eau; Sigma); un volume de 200  $\mu\text{l}$  de réactif est ajouté à 100  $\mu\text{l}$  d'échantillon, incubé 30 minutes à l'obscurité, puis l'absorbance à 550 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque. Une gamme étalon est réalisée pour chaque dosage en utilisant une solution de  $\text{NaNO}_2$ .

## 2) Résultats.

### a) Détection de la formation du conjugué NO-Cys-SAB dans le milieu de culture de macrophages :

5                    Le NO produit *in vitro* par les macrophages  
activés par le BCG, induit la formation de NO-Cys-SAB à  
partir du conjugué Cys-SAB préalablement ajouté dans le  
milieu. Ce dernier joue le rôle d'une cible, de réservoir  
10 et d'une forme stable de NO produit. Le dérivé nitrosylé  
formé est détectable par les expériences de compétition.  
En présence de NMMA, il a été noté une inhibition de la  
synthèse de NO et l'absence de signal.

La figure 6 représente la cinétique de formation  
et la concentration en NO-Cys-SAB formé dans le surnageant  
15 de culture des macrophages activés déterminées à  
différents temps d'incubation: 0, 3, 4, 6, 8, 11, 14, 18,  
et 20 h en utilisant l'antisérum "C". Le même procédé a  
été appliqué aux cellules non activées et au milieu de  
culture seul en présence ou non de NMMA. La concentration  
20 ( $\mu\text{M}$ ) de NO-Cys-SAB formé à partir de la courbe de  
l'avidité de l'antisérum "C" a ensuite été calculée.

Les surnageants de culture des macrophages  
normaux ont été testés de la même façon; aucune formation  
de conjugués nitrosylés n'a été trouvée.

25

### b) Détection des épitopes nitrosylés par le test ELISA :

La SAB nitrosylée a pu être détectée par le test  
ELISA en utilisant les deux Ac "T" et "C" dilués au  
30 1/1000. Ces tests montrent une reconnaissance par ces Ac  
des épitopes tels que le NO-Tyr et le NO-Cys, formés au  
niveau de la NO-SAB.

Les deux Ac ont donné des valeurs du même ordre  
avec les macrophages activés et normaux, en présence ou en  
35 absence de NMMA. Dans le tableau 2 ci-dessous les valeurs  
représentent la moyenne et l'écart-type de 5  
expérimentations.

Tableau 2

	DO (492 nm) / NO-SAB			Concentration de $\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )
	NMMA 0,5mM	anti-NO-Tyr 1/1000	anti-NO-Cys 1/1000	
Macrophages	-	0,241 $\pm 0,051$	0,261 $\pm 0,034$	26,00 $\pm 2,00$
BCG	+	0,096 $\pm 0,018$	0,099 $\pm 0,034$	3,00 $\pm 0,005$
Macrophages	-	0,125 $\pm 0,031$	0,116 $\pm 0,02$	2,00 $\pm 1,00$
Normaux	+	0,143 $\pm 0,004$	0,112 $\pm 0,018$	2,00 $\pm 1,00$

En présence de NMMA, les DO obtenues avec les macrophages activés sont diminuées d'environ 2,5 par rapport à celles obtenues en absence de NMMA. Par contre avec les macrophages normaux, on ne note pas une grande différence dans les DO obtenues en absence ou en présence de NMMA, et d'en postuler alors que ces valeurs ne correspondent pas à une liaison Ac-épitope-NO.

La production de  $\text{NO}_2^-$  a aussi été déterminée pour suivre la synthèse de NO, ainsi lors de l'utilisation de NMMA la concentration de  $\text{NO}_2^-$  est passée de  $\sim 26 \mu\text{M}$  à une valeur de l'ordre de 3. Avec les macrophages normaux aucune différence de la concentration n'a été trouvée.

c) Neutralisation de l'effet cytostatique et cytotoxique de NO par les Ac polyclonaux :

Le rôle cytostatique et/ou cytotoxique de la NO-SAB formée dans les cocultures de macrophages activés / *T. musculi* a été suivi durant plusieurs jours. Nous avons observé que la NO-SAB a inhibé la multiplication des parasites et que l'utilisation des Ac de l'invention a bloqué cet effet. Les mêmes résultats sont obtenus quand

les surnageants contenant NO-SAB ont été transférés dans des puits de co-culture macrophages normaux / *T. musculi*.

Les figures 7 et 8 représentent le nombre de parasites dénombrés tous les jours pendant 4 jours dans les différents puits de culture:

- Après incubation des trypanosomes avec la NO-SAB selon les deux procédés cités dans "Matériels et Méthodes" en absence ou en présence du sérum de lapin normal ou de l'anti-SAB, le nombre des parasites est resté presque stable puis a diminué vers le 4ème jour. Ces résultats montrent l'effet trypanostatique de NO transporté sous la forme de "NO-protéine" et l'effet cutostatique et / ou cytotoxique qui s'est révélé par la diminution du nombre des parasites.

- En revanche, lorsque les Ac "T", "C" ont été ajoutés aux milieux de culture, le nombre des parasites a évolué de 104 à 106 parasites/ml entre les 2ème et le 4ème jours d'incubation. Ce même effet a également été constaté lorsque NMMA a été ajouté dans les milieux de culture des macrophages activés. Ceci montre un rôle inhibiteur de ces molécules sur l'effet cytostatique et cytotoxique dépendant du NO qui pourrait être dû à la NO-SAB ou même aux épitopes nitrosylés (NO-Cys ou NO-Tyr) formés au niveau de la SAB nitrosylée.

La figure 7 représente l'inhibition de l'effet cytostatique des macrophages BCG sur le *T. musculi in vitro* en présence de NMMA (0,5 mM), des antisérum ("T") ou ("C") utilisés au 1/100. Les cocultures de trypanosomes et de macrophages BCG en milieu normal et en milieu supplémenté avec du sérum de lapin normal ou d'Ac anti-SAB, ont été utilisés comme contrôles.

La figure 8 représente l'effet cytostatique des surnageants contenant NO-SAB provenant des macrophages activés et ajoutés à des macrophages normaux contenant des *T. musculi*. Inhibition de cet effet en présence de NMMA (0,5 mM), des antisérum ("T") ou ("C") utilisés au 1/100.



Absence de l'effet inhibiteur en présence d'un sérum de lapin normal ou d'Ac anti-SAB (1/100).

Chaque point des courbes des figures 7 et 8 est le résultat de 4 expériences.

5

### 3) Discussion.

Les résultats ci-dessus montre l'effet cytostatique et/ou cytotoxique de NO (sous forme de NO-SAB) sur les trypanosomes extracellulaires. Ils  
10 révèlent également que les dérivés nitrosylés formés dans les milieux de culture des macrophages activés, en présence de SAB, sont suffisamment stables pour être détectés par voie immunochimique.

La haute spécificité des anticorps polyclonaux  
15 de l'invention a permis le blocage de l'effet de NO "transporté" au niveau des trypanosomes. On peut conclure qu'une des formes de transport de NO lors de ses actions cytostatiques pourrait être (NO-protéine) ou (NO-acide-aminé). Ajoutons aussi que le signal  
20 immunochimique disparaît quand le NMMA est utilisé ou quand le surnageant provient des macrophages normaux avec ou sans NMMA.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence *in vitro* une nitrosylation de la SAB lors de son exposition à  
25 NO produit à pH 7, à partir de macrophages activés par le BCG. Cette nitrosylation se traduit par une modification de certaines molécules. Celles-ci sont cytotoxiques pour les parasites et portent des épitopes nitrosylés, qui sont la tyrosine et la cystéine nitrosylées, reconnus par les  
30 Ac polyclonaux de l'invention.

### IV - PRÉPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE DES CONJUGUÉS NO-CYS-GLUTARALDEHYDE COUPLÉS À UNE PROTÉINE PORTEUSE.

35

Comme déjà indiqué, les dérivés nitrosylés interviennent dans de très nombreux mécanismes

physiologiques et physiopathologiques (inflammation, choc septique, maladies autoimmunes, ... Moncada et al., 1991; Nussler et Billiar, 1993; Stevanovic-Racic et al., 1993; Anggard, 1994) de l'organisme. Il est donc capital  
 5 d'obtenir des molécules capables de détecter et de bloquer ces dérivés NO, qui peuvent détruire des agents pathogènes et bloquer une fonction biologique majeure de l'organisme.

L'approche polyclonale rapporté précédemment a montré la possibilité de blocage de l'effet cytostatique  
 10 et cytotoxique de NO sur les *T. musculi*. Néanmoins, l'hétérogénéité de la réponse immunitaire ne permet pas à ces immunosérums d'être suffisamment performants pour des études complexes où l'attention est portée sur un épitope unique. Pour confirmer l'effet de NO sur les trypanosomes  
 15 et pour éviter des accrochages non spécifiques, il a également été développé une approche monoclonale. Les Inventeurs ont donc induit des Ac monoclonaux dirigés contre le conjugué NO-Cys-G-protéine. Cet Ac monoclonal a servi dans un premier temps comme outil de détection *in*  
 20 *vitro* de certains sites de fixation de NO (tels que la cystéine) au niveau des parasites, et dans un deuxième temps d'inhibition *in vivo* du développement des maladies inflammatoires telles que l'encéphalite autoimmune et l'arthrite inflammatoire expérimentales chez des rattes  
 25 Lewis.

#### 1) Matériel et méthodes.

##### a) Synthèse de l'immunogène :

L'immunogène utilisé dans la production de  
 30 l'anticorps monoclonal est la Cys couplée par le (G) sur la SAB ou SAH puis nitrosylée par le NaNO<sub>2</sub>. conformément au protocole décrit en détail précédemment.

##### b) Voie d'immunisation :

##### 35 - Voie intrapéritonéale (IP):

Des souris âgées de 5 semaines, provenant de la lignée cosanguine Balb/c (IFFA CREDO), ont été immunisées

par voie IP avec 100 µg d'immunogène en adjuvant complet de Freund, pour la première immunisation. Les autres injections ont été faites en utilisant l'adjuvant incomplet de Freund.

5                   - Voie lymphatique: coussinet plantaire (CP) :

A partir d'une solution de 1 mg/ml (dans le TPS) de conjugué, des souris Balb/c ont reçu une injection dans les (CP) tous les trois jours pendant 10 jours (3 injections). Certaines ont reçu une quatrième injection pour augmenter le titre et l'avidité de la réponse Ac.

10                   c) Obtention d'Ac monoclonaux dirigés contre la NO-Cys-G conjuguée par la technique de l'hybridation lymphocytaire et sélection monoclonale :

15                   Les souris ont été immunisées en alternance avec les immunogènes NOCys-G-SAB et NO-Cys-G-SAH; lorsque le titre, l'avidité et la spécificité des Ac produits ont été estimés satisfaisants, les souris sélectionnées ont été  
20                   laissées au repos pendant un mois avant de recevoir un rappel final par voie intraveineuse, 4 jours avant l'hybridation lymphocytaire.

25                   Les cellules spléniques ( $5 \times 10^7$ ) et le myélome SP2/O/Ag ( $2,5 \times 10^7$ ) (Shulman et al., 1978) ont été fusionnés avec du polyéthylène glycol 1500 selon un  
30                   protocole de fusion éprouvé. La technique employée est dérivée de celle proposée par Kohler et Milstein (1975), améliorée par Lane (1985), et adaptée au laboratoire pour les petites molécules (Chagnaud et al., 1987; 1989a, b; 1990). Les cellules fusionnées sont ensuite cultivées en milieu sélectif: RPMI 1640 enrichi en L-glutamine (2 mM), en antibiotiques pénicilline/streptomycine et supplémenté en sérum de veau foetal (10%) contenant 50 µM d'hypoxanthine et 10 µM d'azasérine. Après dix jours de  
35                   culture, les puits contenant des hybridomes ont été dénombrés : Les clones producteurs d'Ac spécifiques ont

ensuite été criblés à l'aide du test ELISA et sous-clonés selon les étapes suivantes:

5 - Pour le premier criblage, tous les clones ont été testés sur les conjugués suivants : NO-Cys-G-SAB, Cys-G-SAB et SAB-G. Les Ac de chèvre anti-Ig de souris sont utilisés à une dilution de 1/5000 pour la révélation des clones positifs et particulièrement spécifique de l'immunogène (NO-Cys-G-BSA).

10 - Ensuite, les clones positifs ont été sous-clonés (Sous-Clonage 1) pour obtenir une cellule/puits. Après une semaine de culture les clones ont été retestés sur des plaques ELISA adsorbées par les conjugués cités ci-dessus;

15 - Après le premier sous-clonage nous avons réalisé des études de la spécificité des clones positifs. Ainsi, une étude de la dilution a été réalisée dans le but d'obtenir une DO ~ 1 pour effectuer les tests de compétitions selon le même procédé que celui décrit précédent;

20 - Les clones qui ont montré une spécificité pour le conjugué NO-Cys-GSAB ont été sous-clonés pour une deuxième fois (Sous-Clonage 2) et retestés sur des conjugués nitrosylés ou non différents : (NO-Cys-G-BSA; Cys-G-BSA; NO-Cys-SAB; Cys-SAB; NO-Tyr-G-SAB; Tyr-G-SAB; 25 NO-Tyr-SAB; Tyr-SAB; SAB-G; ainsi que la NO-SAB). Les résultats de tests ELISA indirects, ainsi que des tests de compétition ont permis de choisir les meilleurs clones;

30 - Après ces deux sous-clonages qui ont permis de s'assurer de la monoclonalité des hybridomes, les clones choisis ont été conservés dans de l'azote liquide. La production en masse des Ac a été effectuée en liquide d'ascites (Potter, 1976) et les Ig ont ensuite été purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium.

## 35 2) Résultats.

a) Analyse spectrophotométrique de l'immunogène utilisé pour l'approche monoclonale :

La nitrosylation du groupement SH de la Cys couplée a été suivie par spectrophotométrie. La figure 9 représente l'analyse spectrométrique de l'immunogène NO-Cys-G-SAB et de son homologue structural Cys-G-SAB en fonction de la longueur d'onde. La bande d'absorbance de NO pour le conjugué NO-CysG-SAB a été détectée entre les longueurs d'ondes 340 et 640 nm. Le spectre du conjugué Cys-G-SAB qui a été obtenu avant nitrosylation montre une absence d'absorbance entre ces deux longueurs d'ondes.

Il convient aussi de remarquer que la zone d'absorbance obtenue avec le NO-Cys-GSAB est plus importante que celle du conjugué NO-Cys-SAB malgré le même rapport de couplage des deux conjugués. Ceci pourrait être dû au type de couplage et donc à l'exposition de l'haptène accessible à NO:

Le tableau 3 ci-dessous donne la structure moléculaire de l'immunogène NO-Cys-G-SAB et Cys-G-SAB :

Tableau 3

Cys-G-SAB (cystéinyglutaraldéhyde)	SH-CH <sub>2</sub> -CH-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -NH-SAB   COOH
NO-Cys-G-SAB (NO-cystéinyglutaraldéhyde)	NO-S-CH <sub>2</sub> -CH-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -NH-SAB   COOH

b) Evolution de l'immunisation des souris :

- Souris immunisée par voie (IP) :

La dilution optimale de l'Ac primaire est de 1/8000. On note l'évolution de deux réponses immunes : une est importante, dirigée contre le NO-Cys-G-SAB a été obtenue après la troisième immunisation. Elle est suivie d'une 2ème qui est plus faible. C'est cette dernière qui a été dirigée contre l'haptène et la protéine porteuse (Cys-G-SAB). LA figure 10 représente l'évolution au cours de l'immunisation de la réponse en anticorps chez la souris immunisée par voie intrapéritonéale. La même

dilution de l'Ac primaire a été utilisée pour l'étude de l'avidité et de la spécificité.

- Souris immunisée dans les (CP) :

5           Après la troisième immunisation, il a été remarqué l'apparition de la réponse dirigée contre le NO-Cys-G-SAB, et l'absence de reconnaissance du Cys-G-SAB. La figure 11 représente l'évolution au cours de l'immunisation de la réponse en anticorps chez la souris immunisée dans les coussinets plantaires (CP). Le titre obtenu après cette immunisation étant insuffisant pour la caractérisation de l'Ac ( $DO < 0,5$ ), une 4<sup>ème</sup> immunisation a été effectuée pour améliorer le titre et l'avidité.

15           c) Caratérisation immunochimique des sérums immuns de souris :

- Etude de l'avidité et de la spécificité des réponses obtenues chez les deux souris injectées par deux voies d'immunisation différentes :

20           L'avidité et la spécificité de la réponse anti-NO-Cys-G-SAB ont été évaluées par rapport à l'immunogène et ses analogues structuraux, nitrosylés ou non.

. Souris immunisée par voie (IP) :

25           La figure 12 représente l'avidité et la spécificité des anticorps anti-NO-Cys-G de la souris (IP). Les courbes de déplacement sont obtenues après des tests de compétitions en présence de l'anticorps et de chacun des conjugués indiqués. Après incubation de l'immunogène avec l'anti-NO-Cys-G-conjugué dilué au 1/8000 l'avidité de cet antisérum a été évaluée au demi-déplacement. Elle est de  $1,1 \times 10^{-8}$  M. Quand aux autres compétiteurs utilisés (Cys-G-SAB; NO-Cys-SAB; Cys-SAB; et la SAB-G) une reconnaissance très faible a été trouvée pour le Cys-SAB et la SAB-G avec respectivement une  $IC_{50}$  de  $10^{-5}$  M et  $5,6 \times 10^{-6}$  M. Malgré ces réactivités croisées le NO-Cys-G-SAB est le conjugué le mieux reconnu.

.. Souris immunisée vOar voie (CP):

La figure 13 représente l'avidité et la spécificité des anticorps anti-NO-Cys-G de la souris (CP). Les courbes de déplacement sont obtenues après des tests de compétitions en présence de l'anticorps et de chacun des conjugués indiqués. Après la quatrième immunisation, les Inventeurs ont remarqué, dans le sérum de cette souris, une augmentation du titre (devenu 1/70 000) et de l'avidité de l'anti-NO-Cys-G-conjugué. L'avidité de l'Ac est calculée à partir de la courbe de déplacement obtenue après incubation du sérum et de l'immunogène de la figure 13. Elle est égale à  $4 \times 10^{-9}$  M.

En ce qui concerne l'étude de la spécificité, les molécules utilisées (Cys-GSAB; NO-Cys-SAB; Cys-SAB et SAB-G) n'ont pas montré un déplacement des valeurs des DO ce qui signifie l'absence d'un accrochage non spécifique avec cet Ac au niveau de ces conjugués.

Par comparaison de ces deux types d'anticorps polyclonaux dirigés contre le même épitope (NO-Cys-G), ne différant que par la voie d'administration de l'immunogène, des valeurs de titre et d'avidité différentes ont été obtenues. En outre, chez la souris immunisée par voie CP la réponse a été plus précoce (au bout de 10-15 jours) (figure 11) et plus spécifique que chez la souris immunisée par voie IP. Pour cette dernière, (figure 10) la réponse immunitaire a été trouvée dans un délai bien reconnu pour cette voie d'immunisation classique et qui varie entre 20 et 30 jours.

d) Caractérisation des anticorps monoclonaux :

Le sang des souris choisies pour la réalisation de cette approche monoclonale a été récupéré au moment du prélèvement de la rate. Le signal sur le conjugué nitrosylé correspondant a été analysé.

Après 10 jours de culture en milieu sélectif, le rendement de la fusion (nombre de puits ayant un ou plusieurs clones) a été de 25 % pour la fusion des

Lymphocytes de la souris immunisée en ([P). En revanche pour la fusion des lymphocytes à partir de la rate de souris immunisée dans les (CP), le rendement a été de 97 %.

5           Tous les puits ont été testés et le rendement (nombre de puits positifs après un test ELISA) voisin de 85%. Tous les hybridomes sélectionnés ont reconnu l'immunogène. Le bruit de fond de la réponse (signal immunologique sur le conjugué non nitrosylé/signal  
10 immunologique sur le conjugué nitrosylé) a été dans tous les cas inférieur à 10%.

Les clones qui reconnaissaient les différents conjugués n'ont pas été sélectionnés.

15           - Avidité des Ac monoclonaux anti-NO-Cys-G conjuguée :

Le surnageant contenant les anticorps monoclonaux anti NO-Cys-G a été dilué au 1/5, et le liquide d'ascites au 1/30 000. Ces dilutions ont été  
20 choisies pour donner une DO optimale  $\approx 1,0$  à 492 nm. La figure 14 rapporte l'avidité et la spécificité des Ac monoclonaux anti-NO-Cys-G. Les courbes sont obtenues après des tests de compétition en présence de l'Ac et de chacun des conjugués indiqués. Ces tests de compétition réalisés  
25 en incubant l'immunogène NO-Cys-G-SAB en présence du surnageant, montrent une avidité de  $4 \times 10^{-9}$  M. Le liquide d'ascites utilisé au 1/30 000 a donné une avidité de  $2,5 \times 10^{-8}$  M. Cette différence dans l'avidité peut être due à la présence dans le liquide d'ascites prélevé à partir de  
30 souris, de facteurs, de protéines ou de complexes immuns qui inhibent les réponses spécifiques.

- Spécificité des Ac monoclonaux anti-NO-Cys-G conjuguée :

35           La spécificité des Ac monoclonaux a été étudiée par incubation du surnageant de culture des hybridomes à une dilution finale de 1/5 avec des conjugués présentant



une analogie structurale avec l'immunogène: Cys-G-SAB ; NO-Cys-SAB; Cys-SAB; NO-Tyr-G-SAB; Tyr-G-SAB; NO-Tyr-SAB; TyrSAB; et la SAB-G. Au demi-déplacement, un seul conjugué Cys-SAB a été reconnu avec une spécificité de  $4 \times 10^{-6}$  M (figure 14). Ces résultats montrent que le conjugué NO-Cys-G-SAB est le mieux reconnu par ces Ac monoclonaux.

Malgré l'absence de compétition avec la NO-SAB, les tests ELISA indirect ont montré que l'Ac monoclonal reconnaît la protéine nitrosylée. Le surnageant (1/5) et le liquide d'ascites (1/30 000) ont donné respectivement, des DO de  $0,36 \pm 0,085$  et  $0,54 \pm 0,12$ . Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois expérimentations.

#### 15                    - Détermination de l'isotypie des Ac monoclonaux produits :

En utilisant un Kit de détection des Ig de souris (Mouse monoclonal antibody, isotyping kit, Sigma), il a été possible de déterminer l'isotypie du clone obtenu: Ig G 2b.

#### 3) Conclusion.

L'analyse des caractéristiques immunochimiques des Ac des souris antiNO-Cys-G conjuguée a montré que:

25                    - la partie immunodominante reconnue par les Ac est toujours l'épitope NO;

30                    - une légère différence structurale entre l'immunogène et ses analogues structuraux est prise en compte par les sites Ac, confirmant le pouvoir discriminateur élevé de ces immunoglobulines.

Ces Ac monoclonaux ont une haute avidité et spécificité; ces caractéristiques immunochimiques ainsi que la reconnaissance de la NO-SAB permettent leur utilisation dans des modèles biologiques bien définis.

V - DÉTECTION D'ANTIGÈNES NITROSYLÉS ET RÔLE  
PROTECTEUR DES ANTICORPS MONOCLONAUX.

Lors de la réponse immune, l'apparition de  
5 molécules effectrices très réactives (dérivés de  
l'oxygène, dérivés de l'azote,...) est susceptible de  
modifier l'antigénicité des éléments reconnus par cette  
réponse. Ainsi, les antigènes portés par les  
microorganismes contre lesquels l'organisme élabore une  
10 réponse immune de type Th1 avec production de dérivés de  
l'azote, peuvent aboutir à des dérivés nitrosylés et  
nitrés. Ces antigènes nitrosylés peuvent donc entraîner la  
synthèse d'anticorps, leur présence et leur rôle éventuel  
sont donc à étudier. Le fait que les dérivés nitrés soient  
15 de bons immunogènes relativement bien connus (Kofler et  
al., 1992; Maeji et al., 1992; Yuhasz et al., 1995), et  
l'existence avérée d'anticorps anti-nitrotyrosine (Beckman  
et al., 1994a) nous ont amenés à postuler l'existence de  
tels anticorps *in vivo*.

20 Les Inventeurs ont donc recherché, dans un  
premier temps, la présence d'antigènes nitrosylés sur les  
cibles parasitaires, par une technique immunocytochimique,  
en utilisant des anticorps anti-nitroso-cystéine (poly- et  
monoclonaux) et anti nitroso-tyrosine (polyclonaux). Dans  
25 un deuxième temps, ces antigènes nitrosylés ayant été  
détectés, ils ont recherché la présence des anticorps  
correspondants dans le sérum des animaux trypanosomés. Les  
trypanosomes représentent une cible privilégiée du NO.  
Dans les trypanosomoses, on constate, en effet une  
30 augmentation considérable du nombre et de l'activité des  
macrophages. Le rôle cytostatique *in vitro* et l'induction  
de la NO-synthase constatée dans les macrophages de souris  
infestées indiquent que le NO pourrait être impliqué dans  
les mécanismes effecteurs contre les parasites. De plus,  
35 les trypanosomes circulant chez leur hôte définitif (forme  
trypomastigote) ont une mitochondrie non fonctionnelle,  
leur énergie dépendant de la glycolyse. Ils représentent

donc des cibles de NO beaucoup moins complexes que les autres agents pathogènes ou les cellules tumorales, d'où l'intérêt de leur étude.

Si l'effet cytostatique du NO sur le trypanosome naturel des souris (*T. musculi*) et sur les trypanosomes du groupe *brucei* (*T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei*), responsables des trypanosomoses humaines et animales a été bien établi *in vitro*, *in vivo* l'effet du NO est beaucoup plus complexe. NO en effet participe aux mécanismes d'immunosuppression en inhibant la transformation et la multiplication des lymphocytes, et de plus il induit l'apoptose. Le rôle immunosuppresseur de NO est important dans les trypanosomoses du fait de la quantité importante du NO produit. C'est pourquoi, il est difficile avec les anticorps polyclonaux et monoclonaux d'appréhender l'étude des molécules nitrosylées et d'un effet éventuellement protecteur lié à l'injection de ces anticorps. Dans un troisième temps, un rôle éventuel de des anticorps poly- et monoclonaux de l'invention, *in vivo* a donc été recherché dans des modèles expérimentaux moins complexes, où le rôle délétère du NO a déjà été fortement incriminé.

#### A - Approche immunocytochimique.

##### 1) Matériel et méthodes.

Des macrophages péritonéaux provenant de souris activées par le BCG (source de NO), et des trypanosomes mis en co-culture, ont été utilisés. La souche parasitaire utilisée est *T. brucei gambiense* (*T. b. gambiense* souche: "Féo" ITMAP/ 1893). Ces parasites ont été entretenus après injection par voie (IP) ( $5 \times 10^3$ /souris) à des souris normales (Noireau et al., 1989).

- Les trypanosomes ont été cultivés dans des boîtes de Pétri (35 mm) (Falcon Plastics) à  $2 \times 10^6$  parasites/ml/boîte dans le milieu de culture Mc Coy 5A modifié (GIBCO) supplémenté avec 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 25 mM Hepes, 2 mM sodium pyruvate,

0,2 mM L-Cystéine en présence de macrophages péritonéaux activés ou non (Albright et Albright 1980; Hirumi et Hirumi 1989; Vincendeau et al., 1985; Oka et al., 1988). Le NMMA a été ajouté dans certaines boîtes à une dilution finale de 0,5 mM. Après 12 h, la survie des parasites est évaluée dans les puits en présence des macrophages normaux ou activés, avec ou sans NMMA. La SAB délipidée a été ajoutée dans le milieu de culture à 4 mg/ml comme porteur de NO. Le surnageant contenant les parasites est récupéré après 12 h pour réaliser une fixation des parasites en vue du test immunocytochimique.

- La fixation des trypanosomes est réalisée sur des lames dégraissées par des solvants organiques (Ether-Alcool). La fixation la plus appropriée à ce protocole est réalisée par cytocentrifugation (Shandon Elliott cytospin) à 100g pendant 10 min. Après fixation, les lames sont séchées, puis après une étape de saturation par le tampon TBS-SAB (1 g/l) les différents anticorps primaires sont ajoutés. L'incubation a lieu pendant 1 h dans une chambre humide à la température ambiante (Harlow et Lane, 1988). L'anticorps monoclonal anti-NO-Cys-G (surnageant) a été utilisé au 1/50; le sérum de souris normale utilisé à la même dilution; les anti-sérums polyclonaux (lapin "T" et "C") et un sérum de lapin non immunisé ont été employés à une dilution finale de 1/10000 pour comparer leurs marquages avec celui de l'anticorps monoclonal. Le tampon seul a été utilisé sur quelques lames comme contrôle négatif.

L'incubation des anticorps primaires est suivie par le traitement des lames par les Ac secondaires marqués à la peroxydase à une dilution de 1/5000 dans le TPS-SAB. La révélation est ensuite réalisée par le 3-3'-Diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB; Sigma) à 60 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03 %) dans le TBS.

## 2) Résultats.

Le marquage immunocytochimique à fort grossissement (x 100) est montré à la figure 15 :

- l'anticorps monoclonal anti-NO-Cys-G:

5       . a donné des marquages (immunoréactivités) bien nets au niveau des trypanosomes co-cultivés en présence des macrophages activés (Photo 1);

10       . un marquage beaucoup plus faible a été obtenu en co-culture de macrophages activés / trypanosomes, en présence de NMMA (0,5 mM) (Photo 2);

      . aucun marquage n'a été obtenu sur les trypanosomes cocultivés avec des macrophages normaux.

15       - Une absence totale de marquage des trypanosomes a été obtenue lors de l'utilisation d'un sérum de souris normale (Photo 3).

      - Aucun marquage des trypanosomes n'a été obtenu lors de l'utilisation de l'anticorps secondaire (anti-Ig souris marqué à la peroxydase) en absence d'un anticorps primaire.

20       Ces resultats affirment la positivité du marquage obtenu dans la photo 1.

- Anticorps polyclonaux "T" et "C" :

25       . l'anticorps "C": la photo 4 de la figure 15 montre une intensité très proche de celle de l'Ac monoclonal;

      . l'anti-NO-Tyr ("T"), donne un marquage positif d'une intensité moins forte que les deux types d'anticorps (mono- et polyclonaux) dirigés contre l'épitope NO-Cys (photo 5);

30       . l'utilisation des Ac "T" et "C" avec les macrophages normaux, a donné un marquage des trypanosomes très faible, en comparaison de ceux obtenus en présence des macrophages activés.

35       - L'Ac primaire d'un lapin normal a donné une absence de marquage (Photo 6).

- Quand les Ac anti-Ig de lapin marqués à la peroxydase ont été utilisés en absence des anticorps primaires, aucun marquage n'a été observé.

### 5                    3) Discussion.

Les travaux réalisés montre l'effet cytostatique et cytotoxique de NO au niveau des parasites extracellulaires tels que les *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* et *T. musculi* (Vincendeau et Daulouède, 1991; Vincendeau et al., 1992; Daulouède et al., 1994), de même que l'effet cytostatique/cytotoxique de NO au niveau des *T. musculi* par la SAB nitrosylée. Cet effet est amplifié en présence d'un porteur protéique dans le milieu de culture et inhibé en présence d'un anticorps "C" ou de NMMA, ce qui démontre le rôle microbicide éventuel de NO.

Ce modèle d'étude de la cytotoxicité de NO est un modèle simple et facile à mettre en évidence par comparaison avec l'utilisation d'autres modèles tels que ceux des cellules tumorales. Ces dernières ont des métabolismes beaucoup plus complexes que celui des trypanosomes, et leur séparation des macrophages est plus difficile que celle des trypanosomes que l'on peut prélever à partir des surnageants de co-cultures (macrophages / parasites).

De plus, *T. b. gambiense* a été utilisé au lieu des *T. musculi* car la seconde souche est beaucoup plus sensible que la première à l'action de NO ou de ses dérivés. Les *T. musculi* nécessitent 48 h pour que NO, produit par des macrophages activés par le BCG, ait un effet cytotoxique de l'ordre de 90%. D'autres molécules, comme la suramine, exerçant un effet sur les trypanosomes, nécessitent un porteur (SAB) pour se fixer au niveau des parasites (Collins et al., 1986; Lopez et al., 1992; Vansterkenburg et al., 1989). NO étant beaucoup plus réactif que la suramine, il nécessite l'utilisation d'un porteur assurant le transport, la stabilité, le relargage et la transnitrosylation. Celle-ci peut avoir lieu par

échange de NO entre protéine porteuse et protéines et/ou acides aminés au niveau des trypanosomes, ainsi que sur d'autres sites parasitaires non encore détectés. La stabilité de la liaison NO au niveau de ces sites peut  
 5 varier de quelques "secondes" voire quelques "heures" avant qu'il ne soit oxydé en  $\text{NO}_2^-$  en présence d' $\text{O}_2$ .

Toutes ces données incitent à utiliser la souche *gambiense* comme cible de NO et la SAB délipidée comme porteur de NO. Pour la détection des dérivés nitrosylés  
 10 telle que la NO-SAB ou des cibles parasitaires qui ont fixé NO, les anticorps monoclonaux anti-NO-Cys-G et les Ac polyclonaux "T" et "C" ont été utilisés. Pour élargir le spectre de détection des produits nitrosylés, l'utilisation d'anticorps dirigés contre différents  
 15 épitopes NO et ayant des avidités différentes permet d'être plus précis dans la résolution du problème posé. Les marquages immunocytochimiques obtenus avec les anticorps poly- et monoclonaux confirment la stabilité des dérivés nitrosylés au niveau des trypanosomes.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives  
 20 *in vivo* et *in vitro*, pour des pathologies mettant en jeu le rôle de NO, telles que les maladies neurodégénératives, maladies inflammatoires chroniques et aiguës, ainsi que des maladies inflammatoires/autoimmunes telles que la  
 25 sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde.

Ces nouvelles perspectives sont fondées sur :

- la mise en évidence chez des souris parasitées d'anticorps développés contre des épitopes nitrosylés;

- le développement chez des rattes Lewis de  
 30 modèles expérimentaux (l'encéphalite autoimmune expérimentale et la polyarthrite à adjuvant) qui sont respectivement des modèles de pathologies humaines: sclérose en plaques et polyarthrite rhumatoïde. Le but est la mise en évidence *in vivo* du rôle de NO dans le  
 35 développement de ces deux pathologies et la neutralisation de ces effets nocifs en utilisant les anticorps monoclonaux de l'invention.

B - Mise en evidence des anticorps dirigés contre des néoantigènes nitrosylés dans le sérum de souris parasitées.

1) Matériel et méthodes.

5 Des souris Swiss sont infestées avec trois souches de parasites : *T. b. gambiense*, *T. b. brucei* (souche: ANTAT 1.1) et *T. musculi*. Chaque souris reçoit 50000 parasites par voie intrapéritonéale. Puis la parasitémie est évaluée à partir du 3ème jour après  
10 infestation. On prélève ensuite le sang des souris au 5ème jours (délai limite de la survie des souris parasitées par *T. b. gambiense* et *T. b. brucei* et au 21ème jour pour les souris infestées par *T. musculi*.

15 Plusieurs conjugués nitrosylés ont été préparés pour cette étude immunoenzymatique : NO-SAB; NO-SAB délipidée; NO-Cys-SAB; NO-Tyr-SAB; NO-Cys-G-SAB; NO-Tyr-G-SAB et NO-Tryp-G-SAB. Les analogues structuraux non nitrosylés ont été aussi utilisés dans les mêmes conditions.

20 Les sérums ont été dilués au 1/1000 et les Ac secondaires ont été utilisés à une dilution finale de 1/5000.

2) Résultats.

25 - Réponse immunologique sur des conjugués nitrosylés :

30 La recherche d'Ac dirigés contre des épitopes nitrosylés dans les sérums des souris trypanosomées a été effectuée sur une population constituée de: 15 souris infestées par *T. musculi* (groupe 1), 15 souris infestées par *T. b. brucei* (groupe 2), et 15 souris infestées par *T. b. gambiense* (groupe 3). Les sérums provenant de 15 souris normales ont été employés comme contrôles.

35 Les moyennes des DO obtenues sur différents épitopes nitrosylés ont été calculées pour chaque groupe de souris cités ci-dessus. Les figures 16 à 22 montrent les valeurs en DO pour les sérums des souris normales et



des souris parasitées. Les DO obtenues sur les molécules ont été corrigées par la soustraction des DO obtenues sur les analogues structuraux non nitrosylés qui ont servi comme blanc dans le test ELISA. Ces figures 16 à 22 correspondent respectivement aux réponses sur les épitopes suivants: NO-SAB; NO-SAB délipidée; NO-Cys-SAB; NO-Cys-G-SAB; NO-Tyr-SAB; NO-Tyr-G-SAB et NO-Tryp-G-SAB. Chaque valeur de DO est une moyenne de 2 déterminations, les barres sur les figures montrent les moyennes (calculées par le test de Mann-Whitney) des DO de chaque groupe de souris.

- NO-SAB et NO-SAB délipidée :

Ces protéines nitrosylées ont été reconnues uniquement par les souris infestées par la souche *T. b. gambiense*. Les moyennes et les écarts-types obtenus sont de  $0,25 \pm 0,029$  (NO-SAB) et  $1,1 \pm 0,006$  (NO-SAB délipidée).

- NO-Cys-SAB et NO-Cys-G-SAB :

Un signal immunologique statiquement significatif ( $p < 0,0001$ ) a été trouvé uniquement chez les souris trypanosomées. Les moyennes et les écarts types obtenus sont les suivants:

Groupe 1 :  $0,75 \pm 0,39$  (NO-Cys-SAB);  $0,87 \pm 0,37$  (NO-Cys-G-SAB);

Groupe 2 :  $0,60 \pm 0,30$  (NO-Cys-SAB);  $0,30 \pm 0,15$  (NO-Cys-G-SAB);

Groupe 3 :  $0,90 \pm 0,34$  (NO-Cys-SAB);  $1,10 \pm 0,41$  (NO-Cys-G-SAB);

- NO-Tyr-SAB, NO-Tyr-G-SAB et NO-Tryp-G-SAB :

Egalement un signal immunologique important et statiquement significatif ( $p < 0,0001$ ) est observé sur ces conjugués dans le sérum des souris trypanosomées, et absent dans le sérum des souris contrôles :

Groupe 1 :  $0,72 \pm 0,53$  (NO-Tyr-SAB);  $0,73 \pm 0,27$  (NO-Tyr-G-SAB);  $0,60 \pm 0,28$  (NO-Tryp-G-SAB);

Groupe 2:  $0,62 \pm 0,30$  (NO-Tyr-SAB);  $0,60 \pm 0,15$  (NO-Tyr-G-SAB);  $0,95 \pm 0,33$  (NO-Tryp-G-SAB);

5           Groupe 3 :  $0,50 \pm 0,26$  (NO-Tyr-SAB);  $0,93 \pm 0,43$  (NO-Tyr-G-SAB);  $0,71 \pm 0,22$  (NO-Tryp-G-SAB);

10           Pour les souris contrôles les moyennes et les écarts-types obtenus sur les différents conjugués sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

NO-SAB	NO-SAB délipidée	NO-Cys- SAB	NO-Cys-G -SAB	NO-Tyr- SAB	NO-Tyr-G -SAB	NO-Tryp -G-SAB
0,02 $\pm 0,02$	0	0,03 $\pm 0,04$	0,10 $\pm 0,03$	0,02 $\pm 0,02$	0,11 $\pm 0,02$	0,11 $\pm 0,01$

### 3) Discussion.

15           Les résultats obtenus montrent:

- Une différence de signaux immunologiques entre les sérums contrôles et ceux de souris parasitées.

20           - Des différences entre les groupes de souris parasitées ainsi qu'entre les différents épitopes utilisés. Ceci pourrait être dû au type de couplage qui joue un rôle dans la présentation de l'épitope nitrosylé couplé à une protéine par une liaison peptidique (carbodiimide) ou par une liaison de type "amine primaire" (G);

25           - Ces données confirment l'implication de NO dans ces parasitoses, qu'on peut résumer comme le résultat d'une activation des macrophages en présence des parasites suivie d'une expression de la iNOS qui libère NO en grande quantité pendant des heures, voire des jours. NO va donc  
30 exercer son effet cytostatique ou cytotoxique sur les parasites en se fixant sur leurs cibles protéiques et/ou au niveau des cellules du soi, formant ainsi des néoépitopes nitrosylés différents. Ces antigènes vont  
35 stimuler le système immunitaire qui va produire des anticorps dirigés contre ces épitopes nitrosylés.

Après avoir obtenu ces résultats chez les animaux et en raison du rôle éventuel de NO dans l'effet cytostatique et cytotoxique sur les parasites intra et extracellulaires, les Inventeurs ont étudié chez des malades atteints de pathologies parasitaires différentes (trypanosomose, toxoplasmose, amibiase, hydatidose, paludisme) l'évolution des signaux immunologiques contre des épitopes nitrosylés. Les résultats obtenus ont montré une différence significative entre les sérums des malades atteints de trypanosomose ou de paludisme et ceux d'autres patients et témoins. Pour les premiers, les meilleurs signaux immunologiques ont été obtenus sur les épitopes NO-Tyr-G et NO-Tryp-G. En revanche, pour les autres, les signaux immunologiques ont été très faibles même sur ces deux épitopes. Les tests ont été effectués sur 20 sérums de chaque pathologie.

#### C - Rôle protecteur des anticorps monoclonaux dans l'encéphalite autoimmune et l'arthrite inflammatoire expérimentales

##### 1) Encéphalite autoimmune expérimentale.

Le modèle de l'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE), a pour objectif de reproduire la démyélinisation observée dans la sclérose en plaques (SEP). C'est une pathologie démyélinisante du système nerveux central (SNC) affectant la substance blanche. La myéline, gaine protectrice de fibres nerveuses est la cible du processus pathologique. La dégradation de celle-ci est responsable de l'apparition des plaques. L'origine de la SEP est très certainement multifactorielle: génétique, environnement, autoimmunité et stress émotionnel (Antel et Cashman, 1991; Poser, 1992; Talbot, 1995). Cependant, l'étiopathogénie exacte demeure inconnue. Plusieurs anomalies de la réponse immune à médiation cellulaire et humorale ont été décrites (Brochet et Orgogozo, 1987; Olsson, 1995). Des hypothèses ont été formulées concernant les réponses autoimmunes qui ont été

trouvées pendant la maladie. Elles provoqueraient une augmentation de la production de NO par les macrophages/microglies, les cellules musculaires lisses et/ou l'endothélium du SNC. Deux mécanismes dans la destruction cellulaire due au NO ont été proposés (Sherman et al., 1992):

- Cytotoxicité directe par NO.
- Lésions dues à la formation de péroxynitrite à partir de l'anion superoxyde et NO.

D'autres travaux ont indiqué le rôle de NO dans la SEP (Offner et al., 1989; Villas et al., 1991; Koprowski et al., 1993; Van Dam et al., 1995; Weinberg et al., 1994), et la présence des auto-Ac contre l'épitope NOCys-G chez des malades (Boullerne et al., 1995).

Pour confirmer toutes ces données postulant le rôle de NO dans la SEP et surtout dans l'EAE, le modèle a été induit chez des ratte Lewis en les immunisant avec un peptide encéphalitogène de la protéine basique de la myéline (PBM) de cobaye supplémenté en *Mycobacterium tuberculosis* dans de l'adjuvant. L'objectif de cette approche est de montrer l'implication du NO dans la création de néoépitoes donc dans la symptomatologie de la maladie, par le blocage de ces épitoes par nos Ac monoclonaux qui pourront avoir un rôle préventif. En parallèle, l'évolution des réponses immunes contre des néoantigènes nitrosylés et nitrés dans les sérums des ratte a été étudiée.

#### a) Matériel et méthodes.

Des modèles d'EAE chez la rate Lewis ont été proposés par différentes équipes (Panitch et Ciccone, 1981; Feurer et al., 1985; Levine, 1986; Polman et al., 1988). Selon ces auteurs, ce modèle induit a comme avantage essentiel une incidence élevée des rechutes et une remarquable prédictibilité.

#### - Antigène encéphalitogène :

5

Tyr-Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ser-Gln-Arg-Ser-Gln-Asp-Glu-Asn  
69 75 80 83

- Animaux.

10

15

25

30

35

- Evaluation clinique des symptômes rhumatologiques et neurologiques :

Les animaux sont observés cliniquement tous les jours après administration de l'émulsion.

5 Les tests cliniques ont été évalués au moyen de critères portant sur :

. L'apparition de l'arthrite qui se caractérise par le score suivant : 0 = pattes normales; 1 = oedème moyen; 2 = oedème plus évolué; 3 = arthrite inflammatoire; 10 4 = arthrite inflammatoire + difficulté à la marche; 5 = arthrite inflammatoire + difficulté à la marche + ulcération; 6 = arthrite inflammatoire et purulente + grande difficulté à la marche + ulcération; 7 = arthrite inflammatoire, purulente, et sanglante + grande difficulté 15 à la marche + ulcération.

. Le comportement et le tonus de chaque animal. Le score clinique suivant a été attribué : 0 = normal; 1 = hypotonie de la queue; 2 = paralysie; 3 = paraplégie; 4 = tétraplégie. Un score égal ou supérieur à 2 est requis 20 pour affirmer l'handicap neurologique (poussée d'EAE). Si ce score établi régresse, les animaux sont en phase de rémission. Par contre, lorsque ce score clinique revient à une valeur au moins égale à 2, les animaux font une rechute (deuxième poussée).

25

- Test immunoenzymatique :

Des prélèvements de sang sont effectués une fois par semaine pendant 5 semaines après l'administration de l'émulsion. Les sérums sont testés à une dilution finale 30 de 1/500 dans les conditions optimales du test. La révélation des signaux a été faite en utilisant des anticorps de lapin anti-Ig de rat marqués à la peroxydase (Sigma) dilués à 1/5000. Ces sérums ont été testés sur les conjugués suivants :

35

. NO-Cys-G-SAB; Cys-G-SAB; et la SAB-G: les deux demiers vont servir pour la correction des DO obtenues sur le conjugué nitrosylé. Le choix du NO-Cys-G-SAB repose sur

le fait que l'anticorps monoclonal utilisé pour bloquer les signes cliniques est dirigé contre cet épitope. La possibilité d'apparition *in vivo* d'un néoantigène de même conformation spatiale et de comportement identique au NO-Cys-G-SAB a été recherché.

Des travaux récents ont mis en évidence la formation des nitrotyrosines dans des sites inflammatoires (Kaur et Halliwell, 1994). Pour détecter la présence des réponses immunologiques dirigées contre ces épitopes dans les sérums des rattes, le NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB et le nitrosotyrosine conjuguée (NO-Tyr-SAB) ont été utilisés. Le Tyr-SAB a été utilisé pour la correction des DO obtenues sur : NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB et NO-Tyr-SAB.

#### b) Résultats.

- Mise au point du modèle d'EAE chez les rattes Lewis par administration du peptide encéphalitogène de cobaye:

Chaque animal des 3 groupes de cette étude a été exploré cliniquement tous les jours pendant 40 jours.

#### . Groupe "Témoin" (PBM seul) :

Trois jours après l'immunisation, on observe l'apparition d'un oedème des pattes postérieures. Quelques jours plus tard les signes rhumatologiques évoluent vers une ulcération. Il s'agit donc d'une arthrite inflammatoire au score moyen de 5.

Vers les dixième-douzième jours : apparition des premiers signes neurologiques: hypotonie de la queue avec difficulté à la marche évoluant vers une paralysie des pattes postérieures. Cet état est suivi par une phase de rémission puis de rechute.

#### . Groupe Aminoguanidine :

Trois rattes sur cinq ont développé la maladie. Les mêmes signes neurologiques et d'arthrite évolutive que chez le groupe précédent ont été observés chez ces rattes. Les deux autres rattes ont développé seulement les signes d'arthrite. Ces résultats indiqueraient que

l'aminoguanidine à une concentration de 25 mg/kg est relativement peu efficace.

. Groupe "Ac monoclonal" :

5 L'objectif principal de ce modèle est de mettre en évidence le rôle de NO dans l'EAE. L' anticorps monoclonal de l'invention développé contre l'épitope NO-Cys-G a montré un rôle protecteur dans le développement de la maladie, et a montré que NO est impliqué dans ce modèle animal. La neutralisation de l'effet du NO par les  
10 Ac au cours de l'apparition des poussées, se manifeste par les observations suivantes :

- absence totale de signes neurologiques : pas d'hypotonie de la queue, de difficulté à la marche ou de paralysie postérieure;
- 15 - absence du développement des signes d'arthrite : il apparait un oedème moyen (score 1) au niveau des sites d'immunisation, sans inflammation, ni ulcération.

Le suivi de ce groupe a montré une absence de maladie chez ces animaux même après 40 jours. Il ne s'agit  
20 donc pas d'un simple retard dans l'apparition de la maladie mais d'une véritable protection. Les résultats de ce travail ouvre une nouvelle voie thérapeutique dans la SEP. La mise en évidence de NO ou de certains épitopes induits au cours de la maladie chez l'homme va servir par  
25 exemple, à comprendre les mécanismes biologiques et pathologiques qui peuvent déclencher la SEP.

- Etude de l'évolution des Ac contre des néoépitopes nitrosylés et nitrés dans le sérum des rattes:

30 Les signaux immunologiques dirigés contre les conjugués NO-Cys-GSAB; NO-Tyr-SAB; NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB ont été recherchés. Les figures 23 à 25 représentent l'étude de l'évolution des anticorps dirigés contre les conjugués NO-Cys-G-SAB, NO-Tyr-SAB et NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB, dans le sérum des  
35 rates (EAE). Les figures 23 à 25 montrent respectivement l'évolution de trois types de réponses immunes chez les



trois groupes "Témoin", "Aminoguanidine" et "Ac monoclonal".

Les tests ont été faits deux fois et les résultats (DO) obtenus sont très similaires entre les rattes d'un même groupe avec des différences non significatives. Nous avons donc tracé toutes ces courbes après calcul des moyennes et des écarts-types des DO obtenues chez toutes les rattes d'un même groupe et sur le même conjugué.

. Groupe "Témoin" :

Pour ce groupe d'animaux une corrélation entre les réponses immunitaires et la clinique au cours du temps est trouvée. De plus, le signal immunologique évolue de façon identique pour les trois conjugués NO-Cys-G-SAB, NO-Tyr-SAB et NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB. Les DO obtenues par le test ELISA sur ces conjugués ne sont pas très importantes (de l'ordre de 0,125) mais on ne peut pas les considérer comme un bruit de fond car elles sont indicatrices de la présence des Ac circulants, dont le taux augmente au moment des poussées et au contraire diminue au moment des rémissions (figure 23).

. Groupe "Aminoguanidine" :

Les réponses anti-NO-Tyr-SAB et anti-NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB sont plus élevées que celles obtenues chez le groupe précédent (avec des DO entre 0,25 et 0,50 à partir de la troisième semaine après l'immunisation. Pour la réponse anti-NO-Cys-G-SAB le titre n'a pas augmenté mais est resté presque stable entre la 1ère et la 4ème semaine (figure 24). Les 3 rattes ayant développé quelques signes neurologiques et les deux autres ont montré des résultats très voisins.

. Groupe "Ac monoclonal" :

Les signaux immunologiques de ce groupe sont différents de ceux des deux premiers groupes. La figure 25 représente l'évolution au cours du temps des réponses anti-NO-Cys-G, anti-NO-Tyr et anti-NO<sub>2</sub>-Tyr. Le NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB est le conjugué le mieux reconnu parmi les trois (DO entre

0,20 et 0,30 après la 3ème semaine). De plus, une différence de reconnaissance entre les deux épitopes Tyr-nitrée et Tyr-nitrosylée, avait lieu par ces Ac induits. Les signaux anti-NO-Cys et anti-NO-Tyr sont restés stables entre la 1ère et la 5ème semaine (DO ~ 0,125) sauf une légère augmentation (après 1 semaine) de l'anti-NO-Tyr, suivie d'une diminution.

Ces tests immunoenzymatiques ont permis d'étudier chez des rattes développant ou non l'EAE, l'évolution des titres en anticorps potentiellement induits *in vivo* après l'apparition des néoantigènes, nitrosylés ou nitrés. Le prélèvement sérique des rattes chaque semaine était limité. Le nombre de tests et des conjugués utilisés l'a été également.

Il convient de remarquer que dans d'autres tests ELISA réalisés une absence de discrimination de ces Ac a été remarqué entre le conjugué NO-Cys-SAB et le conjugué Cys-SAB (couplage carbodiimide). Les DO étaient très identiques sur ces deux conjugués, ce qui implique une liaison non spécifique et que la présentation de la NO-Cys about d'une chaîne carboné (couplage G), donne probablement à ce conjugué une conformation proche de celle de l'épitope *in vivo*.

Ces résultats montrent que :

Des dérivés nitrosylés (particulièrement l'épitope NO-Cys) ou nitrés sont responsables du développement d'EAE chez les rattes Lewis. Ces dérivés possèdent *in vivo* des conformations spatiales identiques aux conjugués NO-Cys-G-SAB; NO-Tyr-SAB; ou NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB adsorbés sur des plaques de microtitration. Ce qui permet aux Ac induits *in vivo* de montrer ces conjugués artificiels comme étant les dérivés contre lesquels ils sont dirigés.

l'Ac monoclonal a un rôle protecteur plus important que celui de l'aminoguanidine.

Ces molécules exercent leurs effets d'une part en neutralisant les néoépitopes nocifs et d'autre part en

stimulant le système immunitaire. Ce dernier induit donc *in vivo*, des anticorps dirigés contre ces néoantigènes générés après immunisation des animaux par une émulsion à caractère "immunogène". Ceci peut expliquer l'augmentation permanente de certains signaux immunologiques chez les groupes des rattes ayant reçu l'aminoguanidine ou l'Ac monoclonal.

## 2) Arthrite inflammatoire expérimentale.

Ce modèle a pour objectif de reproduire les aspects inflammatoires et rhumatologiques présents dans la polyarthrite rhumatoïde (PR). C'est une maladie autoimmune fréquente qui débute sous la forme d'une oligoarthrite inflammatoire des poignets ou des articulations métacarpophalangiennes (Bach, 1993). La PR évolue par poussées survenant plus ou moins fréquentes et entrecoupées de rémissions habituellement incomplètes. Il existerait plusieurs facteurs favorisants tels que des facteurs génétiques, environnementaux, et des facteurs immunitaires (Brostoff et al., 1993).

Le NO a récemment été découvert comme un élément effecteur dans cette pathologie (Stefanovic-Racic et al., 1993; Moilanen et Vapaatalo, 1995). et dans d'autres affections articulaires (Stadler et al., 1991; Stefanovic-Racic et al., 1992). L'excès de sa production peut provoquer des effets cytotoxiques et cytostatiques (Nussler et Billiard, 1993; Stefanovic-Racic et al., 1993; Anggard, 1994).

La présence dans les liquides biologiques des groupements aromatiques et des acides aminés nitrés par le ONOO<sup>-</sup> peut être un marqueur de la destruction cellulaire *in vivo* (Kaur et Halliwell, 1994). Dans les maladies inflammatoires chroniques telles que la PR (Halliwell et al., 1992), la production excessive des radicaux oxygénés libres contribue à la destruction cellulaire. Par ailleurs, NO est reconnu pour participer à la destruction articulaire (Farrell et al., 1992; McCartney-Francis et

al., 1993; Stefanovic-Racic et al., 1993). L'inhibition de la NOS supprime l'arthrite chez la souris (McCartney-Francis et al., 1993).

Récemment, la production de NO a été indirectement mesurée sous forme de nitrites dans les sérums et liquides synoviaux de patients atteints de PR (Grabowski et al., 1996). Des taux élevés en nitrites chez les malades par comparaison aux témoins sains montrent le rôle du NO comme possible agent médiateur dans les maladies rhumatismales.

En tenant compte des données bibliographiques indiquant le rôle de NO dans des maladies inflammatoires en particulier la polyarthrite rhumatoïde à adjuvant (Ialenti et al., 1993; Oyanagui, 1994; Cannon et al., 1995), les Inventeurs ont étudié le modèle d'arthrite à adjuvant, afin de déterminer si les Ac monoclonaux dirigés contre la NO-Cys-G conjuguée sont capables d'inhiber l'effet de NO dans l'induction de cette pathologie, et de rechercher si les épitopes ou les dérivés responsables du développement de la PR seront apparentés à ceux d'EAE.

#### a) Matériel et méthodes.

##### - L'arthrite à adjuvant :

L'ensemble des expérimentations est effectué sur la souche de ratte Lewis. Chaque animal a reçu par voie sous-cutanée dans les coussinets de chaque patte arrière 0,05 ml d'une émulsion d'ACF H37Ra contenant : 0,05 ml de NaCl 0,9 %, plus 0,05 ml d'ACF supplémenté par 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis*.

Des lots homogènes de ratte ont été constitués. Ils ont été soumis aux mêmes conditions que celles utilisées pour le modèle d'EAE. Quatre groupes de 5 ratte, âgées de 7 semaines (poids moyen: 200 g) ont été constitués.

. Groupe "Témoin" : chaque rate de ce groupe a reçu seulement l'émulsion indiquée ci-dessus.

. Groupe de sérum non immun de souris "SNI" : chaque rate a reçu l'émulsion, et après 4 jours une injection par voie sous cutanée, de 5 mg/kg d'immunoglobulines (précipitées au sulfate d'ammonium) de souris normales. L'injection a été faite une fois par jour pendant deux jours.

. Groupe "Aminoguanidine" : chaque rate a reçu l'émulsion, et après 4 jours une injection, par voie sous-cutanée, de l'aminoguanidine (25 mg/kg) une fois par jour pendant deux jours.

. Groupe "Ac monoclonal" : chaque rate a reçu en plus de l'émulsion, et, après 4 jours, 5 mg/kg d'Ac monoclonal anti NO-Cys (précipité au sulfate d'ammonium) par voie sous-cutanée.

#### - Evaluation clinique des symptômes arthritiques:

Une attention particulière a été portée pour détecter l'atteinte articulaire arthritique. L'état inflammatoire des pattes a été apprécié de la façon suivante : oedème de la patte (ne gênant pas la marche); grosse patte; oedème de la patte gênant la marche ou patte "inflammatoire".

En se basant sur le score arthritique déjà cité ci-dessus, il a été possible de suivre chez les rattes de ces 4 groupes l'évolution des signes cliniques au cours du temps pendant 40 jours après l'immunisation.

#### - Test immunoenzymatique :

Les Inventeurs ont recherché dans le sérum des rattes la présence d'Ac dirigés contre des épitopes nitrosylés ou nitrés qui peuvent apparaître *in vivo* au cours du développement de ce modèle. Nous avons donc testé la présence des signaux immunologiques sur les conjugués suivants NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB; NO-Tyr-SAB; Tyr-SAB; NO-Cys-SAB; Cys-SAB et la SAB-G pour les mêmes raisons citées dans le

modèle précédent. Les conditions du test ELISA sont aussi les mêmes.

b) Résultats.

5       - Etude comparative des résultats cliniques :

Groupe "Témoin" et groupe "SNI" : Les rattes de ces deux groupes ont développé les signes typiques d'une arthrite articulaire qui se traduit par :

10       . une apparition d'oedèmes au niveau des coussinets plantaires des pattes postérieures deux jours après l'immunisation;

      . ces signes rhumatologiques ont évolué avec le temps, vers des grosses pattes avec ulcération purulente;

15       . après environ 10 jours, une difficulté à la marche;

      . certaines rattes ont montré des déformations articulaires au niveau des pattes postérieures.

20       En conclusion, ces deux groupes ne présentent pas de différence. Les scores cliniques chez la plupart de ces dix rattes sont passés aux scores 5, 6 et 7. Le sérum de souris non immunisée injecté 4 jours après l'administration de l'antigène, n'a pas eu d'effet sur l'aggravation de la maladie ni d'effet protecteur.

25       Groupe "Aminoguanidine" : Trois rattes ont développé des oedèmes sans difficulté à la marche, puis sont passées aux scores 4 et 5. Les deux autres rattes ont atteint les scores 6 et 7.

30       Groupe "Ac monoclonal" : les résultats obtenus avec ces rattes peuvent être décrits de la façon suivante:

      . apparition au bout de la première semaine seulement d'un oedème moyen chez toutes les rattes;

35       . absence de l'évolution vers le stade d'ulcération;

. pas de difficulté à la marche: les rattes ont conservé leur capacité à s'appuyer normalement sur les pattes postérieures;

. une seule rate a présenté une stade inflammatoire sans difficulté à la marche, ou une présence d'arthrite sanglante ou purulente qui a été observée chez le groupe "Témoin" et le groupe "SNI".

En conclusion, NO ou un de ses dérivés qui peut être la NO-Cys, le peroxy-nitrite, la nitro-tyrosine ou d'autres réactifs oxygénés ont un rôle dans le développement du modèle de polyarthrite articulaire et donc dans les processus inflammatoires.

- Etude de l'évolution des Ac développés contre des néoépitopes nitrosylés et nitrés dans le sérum des rattes :

Les figures 26 à 29 rapportent l'étude de l'évolution des anticorps dirigés contre les conjugués NO-Cys-G-SAB, NO-Tyr-SAB et NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB dans les sérums des rates (PR), la figure 26 pour le groupe "Témoin", la figure 27 pour le groupe "SNI", la figure 28 pour le groupe "Aminoguanidine" et la figure 29 pour le groupe "Anticorps monoclonal". Chaque point représente la moyenne de l'écart type de DO obtenues chez toutes les rattes.

. Groupes "Témoin" et "SNI" :

Les sérums des dix rattes prélevés pendant 5 semaines ont été testés sur les conjugués NO-Cys-G-SAB; NO-Tyr-SAB; NO<sub>2</sub> Tyr-SAB, et sur les conjugués non nitrosylés correspondant. Les figures 26 et 27 montrent chez les groupes "Témoin" et "SNI", respectivement, l'évolution au cours du temps des anticorps induits contre deux épitopes : NO<sub>2</sub>-Tyr-SAB et NO-Tyr-SAB. Ces résultats représentent la moyenne de deux tests. Les DO obtenues dans chaque groupe sont équivalentes sur tous les conjugués testés, chaque point représente la moyenne et

l'écart-type des DO obtenues avec les 5 rattes d'un même groupe pour un même conjugué.

Pour ces deux conjugués les DO obtenues varient entre 1 et 2 entre les 2ème et 5ème semaines. Pour le conjugué NO-Cys-G-SAB les signaux sont très faibles (DO ~ 0,1).

. Les groupes "Aminoguanidine et Ac monoclonal":

Les signaux immunologiques révélés chez les 10 rattes de ces deux groupes sont équivalents entre les rattes d'un même groupe et sur tous les conjugués testés. Les courbes représentent la moyenne de deux tests et les résultats sont analysés de façon identique aux groupes précédents. Comme dans les autres groupes, pour le conjugué NO-Cys-G-SAB les signaux restent très faibles.

Pour le groupe "Aminoguanidine" : (figure 28) l'anti-NO-Tyr est la réponse la plus élevée, les DO sont entre 1,5 et 2 (entre les 2ème et 5ème semaines). La réponse anti-NO2-Tyr est aussi importante, on note une augmentation des signaux entre les 1ère et 2ème semaines. Ils se stabilisent jusqu'à la 3ème semaine puis augmentent légèrement vers la 4ème semaine.

Pour le groupe "Ac monoclonal" (figures 29) : on remarque que chez ces animaux aussi la réponse anti-NO-Tyr est plus importante que celle anti-NO2-Tyr. Mais, on note également qu'un plateau a été trouvé pour les deux types d'Ac et ceci entre les 3ème et 5ème semaines. Ceci peut être dû à une réactivité croisée entre ces Ac puisque les deux réponses ont évolué puis se sont stabilisées aux mêmes périodes. De plus, le taux d'anti-NO-Tyr et d'anti-NO2-Tyr dans le sérum de ces rattes sont légèrement moins importants que ceux obtenus chez les rattes des groupes "SNI" et "Aminoguanidine". Par contre la courbe représentant l'anti-NO-Tyr montre le même aspect et la même amplitude que celle du groupe "Témoin".



Du fait de l'importance des réponses anti-NO-Tyr et anti-NO<sub>2</sub>-Tyr, d'autres tests pour rechercher des Ac anti-NO-Tyr-G-SAB ont été réalisés. Ainsi, des DO obtenues dans les mêmes conditions de test ELISA étaient presque  
 5 négligeables chez les quatres groupes. Ces résultats signifient que la présentation de l'épitope est capitale. Une différence dans la conformation spatiale entre les différents épitopes nitrosylés est sûrement présente *in vivo*. Elle est essentielle pour induire une réponse  
 10 immunitaire.

En conclusion, ces tests immunoenzymatiques n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les quatres groupes. Une augmentation du titre en anticorps induits contre des épitopes nitrosylés et nitrés  
 15 a été trouvée dans chaque prélèvement. Pour le groupe "Ac monoclonal", une protection efficace mais partielle des rattes a été observée, en revanche, les réponses immunologiques obtenues chez les animaux de ce groupe ont été identiques à celles des trois autres groupes.

#### c) Discussion.

La production d'anticorps circulants, a été trouvée dans le sérum des animaux par le test ELISA dans les deux modèles. Pour l'EAE, des travaux récents ont mis  
 25 en évidence la présence d'anticorps anti-NO-Cys-G dans le sérum des rattes qui ont développé cette pathologie (Boullerne, 1996, thèse d'Université). Les travaux ci-dessus confirment l'implication du néoépitope (NO-Cys), parmi d'autres facteurs déclenchant les signes  
 30 neurologiques, dans cette maladie expérimentale et donc la présence *in vivo* des anticorps reconnaissant cet épitope. L'utilisation d'Ac monoclonaux dirigés contre ce même épitope est donc indispensable pour capter ce dernier.

Pour la PR, aucun travail n'a mis en évidence  
 35 l'implication de l'épitope NO-Cys dans le développement de cette maladie. Mais la cystéine (Stamler et al., 1992b) est une cible de la nitrosylation avec la formation de

thionitrites. De plus, une nitration de la tyrosine par le  $\text{ONOO}^-$  par exemple, (Beckman et al., 1994b; Van Der Vliet et al., 1994) donne la nitrotyrosine qui a été mise en évidence dans des processus inflammatoires. Des phénomènes  
5 de transnitrosylation peuvent aussi avoir lieu *in vivo*, entre différentes molécules portant des résidus thiols accessibles au NO (Scharfstein et al., 1994) ce qui donne lieu à plusieurs produits nitrosylés. Dans le modèle de PR à adjuvant, le NO et l'anion superoxyde sont considérés  
10 comme facteurs d'induction et de développement de cette pathologie (Ialenti et al., 1993; Oyanagui, 1994; Cannon et al., 1995). Ce modèle expérimental a été induit chez des rattes injectées avec du mycobacterium en présence ou non d'aminoguanidine ou de l'Ac monoclonal dirigé contre  
15 un épitope NO-conjugué afin de comparer leur rôle protecteur.

La protection des rattes par les Ac contre le développement de la maladie chez les rattes EAE est de 100 %. Les Ac monoclonaux ont un rôle inhibiteur moins  
20 important dans le modèle PR, suggérant l'intervention d'autres facteurs que la NO-Cys dans le déclenchement de la maladie. Il convient également de remarquer la bonne tolérance des Ac monoclonaux de souris par les rattes, du fait de la faible distance immunologique entre souris et  
25 rat.

Par ailleurs, les réponses immunologiques trouvées dans le sérum de tous les animaux contre les conjugués NO-Cys-G-SAB; NO-Tyr-G-SAB et  $\text{NO}_2$ -Tyr-SAB, permettent de suivre et comparer non seulement les signes  
30 cliniques, mais aussi l'apparition et l'accroissement de ces signaux.

Les Ac monoclonaux de l'invention ont permis de mettre en évidence le rôle de NO dans le développement de l'EAE où les résultats obtenus étaient très satisfaisants.  
35 Par contre, l'utilisation de ces Ac chez les rattes développant la PR à adjuvant est moins efficace ce qui

limite l'utilisation de ces Ac monoclonaux à l'épitope contre lequel ils sont dirigés.

## VI - CONCLUSIONS.

5

10

La possibilité d'obtenir l'induction d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre des épitopes nitrosylés, en utilisant des immunogènes synthétisés, a abouti à rechercher la possibilité de cette induction dans des conditions "naturelles". La présence d'Ac dirigés contre des épitopes nitrosylés dans des affections parasitaires où d'une part les quantités d'Ac produits sont considérables et d'autre part l'implication du monoxyde-d'azote a été mise en évidence, a été recherchée.

15

20

25

30

35

Dans ces affections, on constate, en effet, une augmentation du taux d'IFN- $\gamma$ , la mise en évidence de différents rôles du NO et d'une production de nitrites par les macrophages péritonéaux. Dans le cas des travaux montrant *in vitro* le rôle cytotoxique de NO sur les parasites intracellulaires tels que les *Leishmanies*, les macrophages activés ont été identifiés comme cytotoxiques vis-à-vis de ces parasites (Murray et al., 1983; Hall et Titus, 1995). Plus récemment les oxydes d'azote et particulièrement le NO libérés par les macrophages activés, ont été considérés comme des produits indispensables pour leur cytotoxicité intracellulaire contre les *Leishmanies* (Liew et al., 1990; Reiner et Locksley, 1992). Chez l'homme Vouldoukis et coll. ont également mis en évidence cet effet en présence des monocytes humains activés (1995). Ils ont montré que la ligation de CD23 par le complexe IgE-anti-IgE, ou par l'anticorps monoclonal anti-CD23 induit la synthèse de NO. De plus, il y avait une génération de différents cytokines par les monocytes/macrophages humains. Ainsi, la ligation (IgE-anti-IgE)/CD23 induit un effet cytotoxique vis-à-vis des parasites intracellulaire: *Leishmania major* dans les macrophages humains via l'induction de la voie

L-arginine/NO. Ceci a été démontré par une augmentation de NO<sub>2</sub>-, et par le blocage de cet effet par le NMMA. Egalement l'activation de ces macrophages humains par l'IFN<sup>γ</sup>/TNF $\alpha$  induit la même activité leishmanicide inhibée par un anti-TNF $\alpha$ .

D'autres part, les Inventeurs ont montré l'effet cytostatique des monocytes humains vis-à-vis des parasites extracellulaires (*T. gambiense*). En présence de l'Ac monoclonal (anti-NO-Cys-G) ou de NMMA cet effet trypanostatique a été inhibé indiquant alors le rôle de NO. Tous ces résultats montrent la possibilité de l'activation des monocytes humains pour induire un effet cytostatique et / ou cytotoxique sur des microorganismes intracellulaires ou extracellulaires.

Des travaux réalisés *in vivo* ont également montré le rôle du NO dans la défense de l'hôte contre la leishmaniose. Une injection de NMMA à des souris résistantes à cette parasitose, inhibe la production endogène de NO et entraîne une exacerbation des lésions (Evans et al., 1993). Plus récemment, il a été démontré qu'une mutation du gène de la iNOS chez les souris résistantes les rend susceptibles (Wei et al., 1995). Lors des trypanosomoses, on constate une réponse de type "Th1" dirigée contre les antigènes parasitaires (Schleifer et al., 1993). La présence de produits d'origine parasitaire déclenchant la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , et de iNOS entraîne une hyperproduction de NO (Olsson et al., 1991; Sternberg et Mabott, 1996). Outre son rôle antiparasitaire, le NO produit, participe à l'immunosuppression observée au cours de la trypanosomose.

La chronologie et le lieu de production de NO peuvent être déterminants dans l'effet global lié à NO observé dans les trypanosomoses. Chez les souris (C57 BL/6) résistantes à *Plasmodium chabaudi* AS, il y a expression précoce de la iNOS au niveau de la rate, corrélée avec la résistance à l'affection. Chez les souris susceptibles, il y a une expression tardive de la iNOS au

niveau du foie Uacobs et al., 1995). Les mêmes souches de souris sont "résistantes" (C57 BL/6) et susceptibles (BALB/c) à *Leishmania major* (Evans et al., 1993; Wei et al., 1995) et à *T.-musculi* (Albright et Albright, 1981). La protection contre *Leishmania major* est corrélée à une production de NO.

Dans les trypanosomoses provoquées par les trypanosomes du groupe *brucei*, on observe une immunodépression très marquée. L'inhibition de la synthèse de NO prolonge la survie des animaux trypanosomés (Sternberg et al., 1994). Le rôle cytostatique et/ou cytotoxique de NO produit par les macrophages sur *T. musculi* a ainsi été mis en évidence. En utilisant différents conjugués nitrosylés, il a été possible de détecter dans le sérum de souris trypanosomées des Ac dirigés contre plusieurs épitopes nitrosylés. La présence de ces Ac mérite d'être soulignée à plusieurs titres. Tout d'abord, ils apparaissent naturellement au cours d'une réponse immunitaire de type Th1 qui entraîne la production de NO, dont la fixation sur les antigènes provoque des modifications conformationnelles reconnues par le système immunitaire.

Dans différentes affections parasitaires les Ac "induits" ont un rôle de "marqueur" de la parasitose, et peu d'efficacité contre l'agent pathogène; dans certains cas, ils masquent les parasites ou bloquent l'action d'autres Ac, plus efficaces qu'eux. La caractérisation de ces Ac est donc intéressante. Egalement, la mise en évidence de ces Ac aux différentes étapes d'une affection, peut renseigner sur les types successifs de réponses immunitaires mises en jeu. Ainsi, dans certaines affections, la protection est assurée par la succession d'une réponse type "Th1" et d'une réponse type "Th2". L'apparition d'antigènes modifiés par NO et ses dérivés pourrait déclencher l'induction d'une réponse immunitaire de type protecteur ?

Quelque soit leur rôle, la détection d'antigènes nitrosylés peut se révéler très intéressante. Les Ac polyclonaux et monoclonaux peuvent grandement aider à cette détection et se révèlent d'un intérêt capital.

5 Ainsi, des Ac antinitrotyrosine permettent la détection de la nitrotyrosine, dont l'apparition est liée à la présence de peroxynitrite (Van Der Vliet et al., 1994; Ischiropoulos et Al-Mehdi, 1995; Crow, 1996). Cet Ac permet donc de connaître les situations où le

10 peroxynitrite est synthétisé et de détecter les cibles de l'affection. La nitrotyrosine a été visualisée en utilisant des techniques immunologiques au niveau des vaisseaux coronaires lors d'une athérosclérose (Beckman et al., 1994a). De plus, chez les malades atteints de la PR,

15 elle a été détectée dans les liquides synoviaux (Farrell et al., 1992). Mais, malgré une corrélation entre nitration et évolution pathologique, il reste à rechercher si la nitration des tyrosines au niveau des protéines provoque les lésions primaires qui déclenchent

20 l'inflammation, ou si elle est secondaire aux processus inflammatoires. En fait, le peroxynitrite réagit de façon complexe avec les différentes molécules biologiques entraînant l'hydroxylation, la fragmentation de l'ADN, l'oxydation des centres fer-soufre des protéines, etc. et

25 surtout la formation de la nitrotyrosine qui constitue la trace la plus marquante de peroxynitrite. Cette nitrotyrosine ainsi formée, induit des lésions tissulaires via plusieurs mécanismes (Beckman et al., 1994a): 1) altération de la phosphorylation de la tyrosine; 2)

30 altération des fonctions protéiques par introduction de charges négatives sur les sites hydrophobes de la tyrosine, ce qui pourrait altérer la conformation protéique; 3) initiation de processus autoimmuns par la présence des nitrophénols telle que la nitrotyrosine,

35 reconnue très antigénique (Kofler et al., 1992; Maeji et al., 1992; Mizutani et al., 1995; Yuhasz et al., 1995).

A partir de ces données montrant le rôle de nitrotyrosine dans des processus inflammatoires et destructifs, il est possible de déduire que les Ac dirigés contre les différents éléments dérivés du NO peuvent également permettre leur caractérisation et la connaissance de leur propriétés. Citons par exemple, le rôle bien connu des thiols, des S-nitrosothiols et de la Snitrosoalbumine dans la vasodilatation *in vivo* et *in vitro* (Stamler et al., 1992c, d; Keaney et al., 1993; Simon et al., 1993). Grâce aux Ac anti-NO-Cys, une fonction immunitaire portée par l'albumine a pu être établie. Rappelons ici que la NO-SAB peut servir de réservoir de NO dans le plasma, à partir duquel NO peut être transporté vers le milieu intracellulaire par un mécanisme de transnitrosylation. Après son transport, NO a accès à ses cibles intracellulaires telles que la guanylate cyclase ou les hémoprotéines, ce qui résulte en une activité physiologique qui peut devenir pathologique en cas d'altération au niveau de la transnitrosylation.

La forme NOSAB formée à partir d'une source biologique (macrophages) a été largement utilisé, mais, dans un premier temps, d'autres molécules nitrosylées synthétisées à pH acide à partir d'un donneur de NO ont été utilisées. Ceci a permis de développer des Ac poly- et monoclonaux. Dans un deuxième temps, la présence des molécules nitrosylées a été détectée en utilisant ces Ac. Ces dérivés nitrosylés étaient synthétisés dans des co-cultures: macrophages activés / SAB ou macrophages activés / SAB / parasites. La détection a été réalisée non seulement par la technique immunoenzymatique mais aussi par la révélation du rôle cytotoxique de NO sur des parasites extracellulaires. Cet effet de NO est amplifié lors de la présence de la protéine porteuse, la SAB, et a été neutralisé en présence des Anticorps de l'invention. Les macrophages activés produisent NO, mais peuvent aussi produire d'autres dérivés oxygénés tels que HOCl (De

Violet et al., 1984; Vincendeau et al., 1989),  $H_2O_2$  (Vincendeau et al., 1981), et surtout  $O_2^{\cdot -}$ . La question posée est de savoir si la présence de cet anion est nécessaire à la formation de l'albumine nitrosylée.

5                     $O_2^{\cdot -}$  ou un autre dérivé de l'oxygène ( $H_2O_2$ , HOCl) peut être l'élément réagissant avec NO. Il est connu en effet que les neutrophiles et les macrophages murins produisent simultanément NO et  $H_2O_2$  ainsi que d'autres espèces réactives oxygénées qui participent à la  
10                    cytotoxicité (Pacelli et al., 1995).

Il est en effet connu que les dérivés de l'azote et de l'oxygène peuvent également interagir pour former des dérivés ayant différentes fonctions. La neutralisation de ces fonctions par un blocage sélectif de telle ou telle  
15                    molécule peut se révéler très instructive. De plus, il convient de remarquer que, lors de l'utilisation d'un donneur chimique de NO ( $NaNO_2$ ), un pH acide était nécessaire pour réaliser la nitrosylation. Par contre, dans le milieu de culture le pH est neutre. Nous pouvons  
20                    répondre à cette question en tenant compte des données de Kharitonov qui montre qu'une nitrosylation peut avoir lieu *in vitro*, en milieu oxygéné et à pH 7 par le biais de  $N_2O_3$  (Kharitonov et al., 1995), même si cette nitrosylation est moins importante que celle de la Cys ou le Glutathione,  
25                    par exemple. Mais, pour répondre à cette question, il faudra mettre en oeuvre des piègeurs de dérivés oxygénés tels que SOD, catalase, taurine, qui permettront d'étudier la nitrosylation *in vitro*, à pH neutre.

La nitrosylation de la SAB *in vitro* et l'effet  
30                    cytotoxique correspondant, incitent à éclaircir un point important concernant les expérimentations réalisées dans des conditions légèrement différentes :

- Dans les premières conditions, les trypanosomes et la SAB ont été incubés ensemble. Les  
35                    macrophages activés vont produire NO, mais aussi de nombreux autres radicaux libres. Ainsi, des dérivés oxygénés, toxiques ou non, seront formés. Ceci nous permet



de postuler que, pendant l'incubation, ces dérivés pourraient agir "en compétition" avec NO sur les trypanosomes pour masquer et/ou interférer avec son effet toxique.

5                   - D'où l'intérêt des secondes conditions expérimentales où la SAB a été placée en présence de macrophages activés pour être nitrosylée. Puis, la NOSAB formée a été transférée dans des milieux de co-cultures parasites / macrophages normaux qui ne produisent pas ou  
10                   très peu des radicaux libres. Dans ces conditions, on peut admettre que l'effet de la NO-SAB ajoutée dans ces cultures, pauvres en radicaux libres, est dû à NO et non pas à d'autres dérivés oxygénés.

15                   - Les résultats obtenus au cours de ces expérimentations ont été confirmés en utilisant un Ac anti-SAB. Lors de l'utilisation de cet antisérum, l'effet trypanocide de la NO-SAB a persisté dans les premières et les deuxièmes conditions. Ceci indique que l'effet neutralisant, observé en présence des Ac "T" ou "C", est  
20                   propre à ces derniers malgré leur caractère polyclonal.

                  Il convient aussi d'ajouter que les secondes conditions ont permis également de montrer l'absence d'un effet "stimulateur" ou "inhibiteur" des complexes immuns qui pourraient être formés au niveau des macrophages. En  
25                   effet, l'utilisation des macrophages normaux (n'exprimant pas la iNOS), en présence des Ac polyclonaux, des trypanosomes, et du surnageant contenant la SAB nitrosylée, a montré des résultats équivalents à ceux obtenus selon les premières conditions. Ceci montrent que  
30                   quelque soit l'influence de complexes immuns au niveau des macrophages activés, la production de NO à partir de ces cellules (exprimant la iNOS) n'a pas été modifiée. Ainsi, nous déduisons que selon ces deux conditions, l'effet cytotoxique de NO sur les *T. musculi* est dû  
35                   particulièrement à la formation de la NO-SAB. Celle-ci a donc exercé cet effet soit par la libération de NO qui s'est fixé sur ses cibles, soit par un mécanisme d'échange

de NO entre la SAB et les acides aminés ou les protéines parasitaires.

5 La mise en évidence de la formation de dérivés nitrosylés *in vitro* par les tests immunoenzymatiques, ou par l'effet cytotoxique a conduit à rechercher les sites de fixation de NO au niveau de ces parasites. Cette recherche a débuté par l'utilisation de la technique immunocytochimique :

10 - Les meilleurs résultats étaient obtenus avec les macrophages activés. Les Ac poly et monoclonaux ont servi comme outils de marquage des sites de fixation de NO au niveau des parasites. Ces résultats ont été très reproductibles, ce qui n'était pas le cas lors de l'utilisation de  $\text{NaNO}_2$  ou de NO-SAB synthétisés chimiquement. Avec ces molécules, la demi-vie des trypanosomes ne dépassait pas 10 min et leur forme n'était pas conservée. Nous avons expliqué ce fait par la présence d'excès de NO libéré par ces donneurs chimiques, qui avaient une action intense sur les parasites se traduisant par leur lyse.

20 - L'utilisation de contrôles a donné des marquages faibles ou une absence totale d'immunoréactivité. Ceci a confirmé la positivité des marquages obtenus en présence des macrophages activés (sans NMMA) avec les Ac poly et monoclonaux utilisés comme Ac primaires.

25 Ces Ac spécifiques des épitopes nitrosylés, ont montré la présence d'au moins des résidus cystéines et tyrosines nitrosylés. Ceux-ci ont été reconnus par leur Ac correspondant. Cette immunoréactivité pourrait être expliquée soit par la fixation de la SAB nitrosylée à la surface parasitaire, soit par des mécanismes de transnitrosylation entre cette molécule et les antigènes parasitaires portant un résidu thiol. Leur nitrosylation pourrait donc être à l'origine de l'effet cytostatique

30

35 médié par la NO-SAB. En effet, des nombreuses études ont mis en évidence le rôle de NO dans la modulation de l'activité de certaines protéines en se fixant sur leur

résidu thiol (Stamler et al., 1994) ce qui permet la  
régulation de certains mécanismes cellulaires. Parmi  
celles-ci nous citons la guanylate cyclase soluble  
(Stamler et al., 1992a); le récepteur NMDA (Lipton et al.  
5 1993); protéine kinase C (Gopalakrishna et al., 1994>; le  
p21ras (Lander et al., 1995); GADPH (Mohr et al., 1996)  
ainsi que le facteur de transcription OxyR (Hausladen et  
al., 1996). La transnitrosylation de NO à partir de la SAB  
à des thiols des molécules biologiques, dépend de la  
10 réactivité de ces molécules, de celle de la SAB ainsi que  
de la stabilité de S-nitrosothiol formé (Scharfstein et  
al., 1994). Donc, pour identifier ces molécules  
nitrosylées détectées au niveau des trypanosomes, des  
expérimentations par immunoempreintes utilisant le gaz NO  
15 ou le  $\text{NaNO}_2$  pour la nitrosylation des protéines  
parasitaires sont envisageables. Ces expérimentations  
autorisent la détection de sites protéiques ayant été  
accessibles au phénomène de nitrosylation *in vitro*. Les  
résultats obtenus sont très préliminaires et peu  
20 satisfaisants. En effet, la nitrosylation selon des  
conditions bien déterminées pourrait entraîner une  
meilleure accessibilité aux Ac correspondants. Notons que  
cette hypothèse a déjà été citée pour des dérivés nitrés  
(Crow, 1996).

25 L'optimisation de ce protocole peut être obtenue  
en utilisant les macrophages activés comme donneurs du NO.  
Des mécanismes intervenant lors du contact parasites /  
cellules activées, aidant à la nitrosylation et à la  
modification structurale des cibles protéiques peuvent  
30 être envisagés. Après leur nitrosylation à partir des  
donneurs chimiques du NO, les protéines seront peut être  
mieux reconnues par les Ac que lorsqu'elles sont  
nitrosylées chimiquement. Il est important de noter ici,  
qu'une différence significative entre la nitrosylation  
35 produite par NO synthétisé enzymatiquement et celle  
réalisée par des donneurs chimiques de NO a été démontrée  
(Ignarro et al., 1993). Enfin, il existe probablement

d'autres sites de nitrosylation sur les parasites, autres acides aminés (lysine, tryptophane, etc.), centres fer-souffre de certaines enzymes, etc.

Après ces travaux *in vitro*, le rôle pathologique de NO a été étudié *in vivo*. NO a été mis en évidence dans des nombreuses pathologies (Bagasra et al., 1995; Moilanen et Vapaatalo, 1995; Grabowski et al., 1996). Par exemple, dans le cas du choc septique, l'expression de la iNOS dans le système vasculaire aboutit à une vasodilatation, une diminution de l'activité vasoconstrictrice, une hypotension, et une destruction tissulaire (Petros et al., 1994). Mais, ces modifications au niveau du système vasculaire, ne sont pas strictement dues au NO libre. Des nombreux travaux *in vivo* et *in vitro* ont montré que des dérivés S-nitrosylés sont des composés vasodilatateurs, inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, et régulateurs du débit sanguin et de la tension artérielle. Les plus étudiés sont les S-nitrosocystéines, S-nitrosoalbumine, et même l'hémoglobine-S-nitrosylée (Stamler et al., 1992b, c, d; Keaney et al., 1993; Jia et al., 1996). Ces molécules, caractérisées par une demi-vie plus longue que celle de NO (Stamler et al., 1992c), vont participer à l'aggravation et l'évolution des processus pathologiques dans le choc septique. Ceux-ci sont probablement dues à l'augmentation de la production du GMPc à partir de la guanylate cyclase, et au phénomène d'échange de NO entre les thiols des protéines et les thiols de faible poids moléculaire. Ceci induit une cascade d'événements prolongeant l'effet nocif du NO surtout au niveau vasculaire.

Il convient de rappeler aussi que dans d'autres conditions pathologiques la production excessive de NO *in vivo* peut provoquer des troubles neurologiques variés. Par exemple, des travaux ont permis d'établir que certaines populations neuronales sont résistantes aux effets toxiques induit par la libération d'acides aminés excitateurs tel que le glutamate, alors qu'elles produisent des quantités toxiques de NO (Beal et al.,

1986; Koh et al., 1986; Koh et Choi, 1988). Ces neurones semblent être également préservées dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou la chorée d'Huntington où le rôle de NO a été mis en évidence (Ferrante et al., 1985; Meldrum et Garthwaite, 1990; Olney, 1991). Plus récemment, NO a été identifié comme un élément effecteur des troubles neurologiques observée chez des malades atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (Bukrinsky et al., 1995; Lipton et Gendelman, 1995). Le NO est considéré comme nécessaire mais pas suffisant pour induire la mort cellulaire. Il peut réagir avec d'autres radicaux libres tels que les superoxydes, donnant lieu à la formation de peroxynitrite, espèce chimique particulièrement toxique (Beckman et al., 1990; Radi et al., 1991).

Le NO est également un des médiateurs impliqués dans différentes maladies "autoimmunes". Ainsi, par exemple, il participerait à la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et entraînerait l'apparition d'un diabète (Welsh et al., 1994; Lindsay et al., 1995; McDaniel et al., 1996). De plus, NO synthétisé peut se fixer sur des acides aminés (surtout la cystéine et la tyrosine), entraînant une nitrosylation et une modification des protéines ou des enzymes au niveau tissulaire. Ces protéines du soi peuvent donc devenir, dans des conditions pathologiques, des molécules étrangères à l'organisme induisant chez l'homme des auto-anticorps, comme dans le cas de la sclérose en plaques et de la polyarthrite inflammatoire. La nitrosylation d'antigènes et l'apparition d'Ac correspondants serait un phénomène naturel, éventuellement majoré par une surproduction de NO. Le rôle de ces dérivés nitrosylés antigéniques pourrait être la destruction des cellules cibles qui les portent. Ainsi, la nitrosylation d'antigènes microbiens pourrait s'accompagner de celles d'antigènes du soi. Les Ac produits outre leur divers rôles sur les antigènes exogènes, pourraient également agir sur le soi. Selon la

quantité produite, les propriétés biologiques liées à l'isotypie de l'Ac, et son affinité, différents résultats pourraient être observés: destruction des cellules, masquage des épitopes entraînant la protection, etc...

5 D'un point de vue expérimental, l'intervention du NO dans les pathologies inflammatoires et immunes expérimentales induites chez la rate Lewis est maintenant bien établie. Plusieurs auteurs ont rapporté par des approches différentes que NO pourrait avoir un rôle  
10 important dans ces processus dégénératifs, l'un touchant la myéline centrale, l'autre l'articulation et sa synoviale.

Deux modèles animaux ont été développés dans le cadre de l'invention. Le premier qui mime l'évolution  
15 neurologique de la SEP et le second qui consiste en un modèle d'arthrite inflammatoire à adjuvant. Le rôle de NO et des dérivés nitrés dans les processus inflammatoires et la destruction tissulaire a été démontré (Halliwell et al., 1992; Winyard et al., 1992; Morris et al., 1995).  
20 Ensuite, des Ac circulants d'apparition précoce après l'induction des modèles expérimentaux ont été mis en évidence. Ces immunoglobulines reconnaissent trois cibles antigéniques portant NO ou NO<sub>2</sub> NO-Cys-G, NO-Tyr et NO<sub>2</sub>-Tyr. Leur présence pourrait signer une stimulation  
25 antigénique liée à l'hyperproduction de NO. D'autre part, l'analyse des processus physiopathologiques, cliniques et immunologiques, confirme une augmentation de la production du NO. Celle-ci pourrait être principalement localisée au niveau des lésions et sans doute en rapport avec la  
30 stimulation macrophagique. Mais les cibles endogènes: Cys et Tyr transporteurs potentiels de NO sont-elles des éléments clés dans la physiopathogénie ? Les effets thérapeutiques de l'Ac monoclonal anti-NO-Cys-G soulignent le rôle potentiel joué par l'épitope NO-Cys. La  
35 reconnaissance *in vivo* de cette cible entraîne l'abolition des symptômes d'EAE et diminue considérablement l'arthrite inflammatoire. L'antigène NO-Cys apparaît donc dans ces

conditions comme une étape clé conduisant vers la destruction myélinique pour l'EAE et l'inflammation de la synoviale dans l'arthrite.

5 La présence d'Ac dans le sérum des animaux  
expérimentaux et le rôle protecteur des Ac injectés,  
indiquent que la neutralisation de l'épitope NO-CysG joue  
un rôle protecteur important. L'absence de protection chez  
les animaux non injectés, malgré la présence des Ac,  
10 indique que (i) les Ac produits ont une affinité trop  
faible, ou sont en quantité insuffisante, ou produits trop  
tardivement. (ii) Les Ac produits n'ont pas les mêmes  
fonctions ou sont peut être d'un autre isotype que les Ac  
injectés. La détermination isotypique, l'étude  
15 immunochimique des Ac produits, leur purification puis  
leur injection à des animaux expérimentaux permettront de  
répondre à ces questions.

Enfin, les deux modèles animaux utilisés ont  
permis d'obtenir des résultats importants. En prenant  
l'EAE (modèle expérimental de la SEP chez l'homme), pour  
20 laquelle une protection presque totale a été notée, les  
résultats obtenus constitue une approche thérapeutique de  
la SEP.

## Références

- ADAMS M. L., NOCK B., TRUONG R., AND CICERO T. J. 1992. Life Sci. 50, PL35-PL40.
- 5       - AHVAZI B. C., JACOBS P., AND STEVENSON M. M. 1995. J. Leukoc. Biol. 58, 23-31.
- ALBINA J. E., CALDWELL M. D., HENRY W. L., AND MILLS C. D. 1989a. J. Exp. Med. 169, 1021-1029.
- ALBINA J. E., MILLS C. D., HENRY W. L., AND  
10 CALDWELL M. D. 1989b. J. Immunol. 143, 3641-3646.
- ALBINA J. E., AND HENRY W. L. JR. 1991. J. Surg Res. 50, 403-409.
- ALBINA J. E., ABATE J. A., AND HENRY W. L. JR. 1991. J. Immunol. 147, 144-148.
- 15       - ALBRIGHT J. W., AND ALBRIGHT J. F. 1980. Int. J. Parasitol. 10, 137-142.
- ALBRIGHT J. W., AND ALBRIGHT J. F. 1981. Infect. Immun. 33, 364-371.
- ANGGARD E. 1994. Lancet. 343, 1199-1206.
- 20       - ANTEL J. P., AND CASHMAN N. R. 1991. Mayo. Clin. Proc. 66, 752-755.
- ASSREUY J., CUNHA F. Q., LIEW F. Y., AND MONCADA S. 1993. Br. J. Pharmacol. 108, 833-837.
- ATASSI Z. 1984. Eur. J. Biochem. 145, 1-20.
- 25       - BACH J. F. 1993. Traité d'Immunologie: Médecine-Sciences/Flammarion, p 892.
- BAGASRA O., MICHAELS F. H., ZHENG Y. M., BOBROSLI L. E., SPITSIN S. V., FANG FU Z., TAWADROS R., AND KOPROWSKI H. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92,  
30 12041-12045.
- BARINAGA M. 1991. Science 254, 1296-1297.
- BAWIN S. M., SATMARY W. M., JONES R. A., AND ADEY W. R. 1995a. Meeting Abstract, BEMS Annual Meeting, Boston, MA.
- 35       - BAWIN S. M., SATMARY W. M., JONES R. A., ZASTROW N. K., AND ADEY W. R. 1995b. Annual Contractors Review. Palm Springs, CA.



- BEAL M. F., KOWALL N. W., ELLISON D. W.,  
MAZUREK M. F., SWARTZ K. J., AND MARTIN J. B. 1986.  
Nature. 321, 168-171.

- BECKMAN J. S., BECKMAN T. W., CHEN J.,  
5 MARSHALL P. A., AND FREEMAN B. A. 1990. Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA. 87, 1620-1624.

- BECKMAN J. S. 1991. J. Dev. Physiol. 15,  
53-59.

- BECKMAN J. S., YE Y. Z., ANDERSON P. G., CHEN  
10 J., ACCAVITTI M. A., TARPEY M. M., AND WHITE C. R. 1994a.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 375, 81-88.

- BECKMAN J. S., CHEN J., ISCHIROPOULOS H., AND  
CROW J. P. 1994b. Methods Enzymol. 233, 229-240.

- BLASI, E., PITZURRA L., PULITI M., CHIMIENTI  
15 A. R., MAZOLLA R., BARLUZZI R., AND BISTONY F. 1995.  
Infect. Immun. 63, 1806-1809.

- BOUCHER M., RENAUDIN M-H., RAVEAU C., MERCIER  
J-C. DEHAN M, AND ZUPAN V. 1993. Lancet. 341, 968-969.

- BOULLERNE A.I., PETRY K. G., MEYNARD M., AND  
20 GEFFARD M. 1995. J. Neuroimmunol. 60, 117-124.

- BOULLERNE A. 1996. Thèse de l'Université de  
Bordeaux II.

- BREDT D. S., AND SNYDER S. H. 1989. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA. 86, 9030-9033.

- BREDT D. S., AND SNYDER S. H. 1990. Proc.  
25 Natl. Acad. Sci. USA. 87, 682-685.

- BREDT D. S., HWANG P. M., GLATT C. E.,  
LOWENSTEIN C., REED R. R., AND SNYDER S. H. 1991. Nature.  
351, 714-718.

- BROCHET B. AND ORGOGOZO J. M. 1987. Semaine  
30 des Hôpitaux de Paris. 63, 1909-1918.

- BROSTOFF J., SCADDING G. K., MALE D., ROITT I.  
M. 1993. Immunologie Clinique, Boeck Université. p. 49.

- BUISSON A., MARGAILL I., CALLEBERT J.,  
35 PLOTKINE M., AND BOULU R. G. 1993. J. Neurochem. 61,  
690-696.

- BUKRINSKY M. I., NOTTET H. S. L. M., SCHMIDTMAYEROVA H., DUBROVSKY L., FLANAGAN C. R., MULLINS M. E., LIPTON S. A., AND GENDELMAN H. E. 1995. J. Exp. Med. 181, 735-744.
- 5       - BURCZYNSKI F. J., WANG GU-QI., AND HNATOWINCH M. 1995. Biochemical Pharmacology. 49, 91 96.
- BUTLER A. R., FLITNEY F. W., AND WILLIAMS D. L. H. 1995. TIPS. 16, 19-22.
- CADOSSO R., ZUCCHINI P., EMILIA G., TORELLI G., BERSANI F., BOLOGNANI L., COSSARIZZA A., PETRINI M., AND FRANCESCHI C. 1994. Frey ed., Landes Co, pp. 157-166.
- 10       - CALMELS S., AND OHSHIMA H. 1995. Sang Thrombose Vaisseaux. 7, 33-37.
- CAMPISTRON G., GEFFARD M., AND BUIJS R. 1986.
- 15       J. Neurochem. 46, 862-868.
- CANNON G. W., REMMERS E. F., WILDER R. L., HIBBS J. B., JR., AND GRIFFITHS M. M. 1995. Trans. Proc. 27, 15431544.
- CHAGNAUD J. L., MONS N., TUFFET S., GRANDIER-VAZEILLE X., AND GEFFARD M. 1987. J. Neurochem. 49, 487-497.
- 20       - CHAGNAUD J. L., CAMPISTRON G., AND GEFFARD M. 1989a. Brain Res. 481, 175-180.
- CHAGNAUD J. L., SOUAN M. L., CHARRIER M. C., AND GEFFARD M. 1989b. J. Neurochem. 53, 383-391.
- 25       - CHAGNAUD J. L., GOSSET I., BROCHET B., AUDHI 1Y S., AND GEFFARD M. 1990. Neuroreport. 1, 141-145.
- CHEN P. Y., AND SANDERS P. W. 1991. J. Clin. Invest. 88, 1559-1567.
- 30       - CHIABRERA A., CADOSSO R., BERSANI F., FRANCESCHI C., AND BIANCO B. 1994. Biol. Effects of Electric and Magn. Fields, Carpenter D. O. Ed. 2, 121-145.
- CHOI D. W. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 9741-9743.
- 35       - COENE M. C., HERMAN A. G., JORDAENS F, VANE HOVE C., VERBEUREN T. J., AND ZONNEKEYN L. 1985. Br. J. Pharmacol. 85, 267P.

- COLLINS J. M., KLECKER R., W., YARCHOAN R.,  
CLIFFORD LANE H., FAUCI A. S., REDFIELD R. R., BRODER S.,  
AND MYERS C. 1986. J. Clin. Pharmacol. 26, 22-26.

- CORBETT J. A., SWEETLAND M. A., WANG J. L.,  
LANCASTER J. R., AND MCDANIEL M. L. 1993. Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA. 90, 1731-1735.

- COZENS F. L., SCAIANO J. C., AND KOROLENKO E.  
K. 1995. Meeting Abstract, BEMS Annual Meeting, Boston,  
MA.

- CROW J. P. 1996. 2ème Symposium ICSN.

- DAULOUEDE S., OKOMO-ASSOUMOU M. -C., LABASSA  
M., FOUQUET CH., ET VINCENDEAU P. 1994. Bull. Sci. Path.  
Exp. 87, 330-332.

- DAWSON V. L., DAWSON T. M., BARTLY D. A., UHI  
G. R., AND SNYDER S. H. 1993. J. Neurosc. 13, 2651-2661.

- DESAI K. M., SESSA W. C., AND VANE J. R. 1991.  
Nature. 351, 477-479.

- DE VIOLET P. F., VEYRET B., VINCENDEAU P., AND  
CARISTAN A. 1984. Photochem. and Photobiol. 39, 707-712.

- DIAS-DA-MOTTA P., ARRUDA V. R., MUSCARA M. N.,  
SAAD S. T., DE NUCCI G., COSTA F. F., AND CONDINO-NETO A.  
1996. Br. J. Haematol. 93, 333-340.

- DING A. H., NATHAN C. F., AND STUEHR D. J.  
1988. J. Immunol. 141, 2407-2412.

- DRAPIER J.-C., AND HIBBS J. B., JR. 1986. J.  
Clin. Invest. 78, 790-797.

- DRAPIER J.-C., AND HIBBS J. B., JR. 1988. J.  
Immunol. 140, 2829-2838.

- DRAPIER J.-C., WIETZERBIN J., AND HIBBS J. B.  
JR. 1988. Eur. J. Immunol. 18, 1587-1592.

- DRAPIER J.-C., PELLAT C., AND HENRY Y. 1991.  
J. Biol. Chem. 266, 10162-10167.

- DRAPIER J.-C. 1993. NO et macrophages. Sang  
Thrombose Vaisseaux. 5, 205-208.

- DUCROCQ C., GUISSANI A., TENU J.-P., AND HENRY  
Y. 1994. Chimie et biochimie du monoxyde d'azote. II -  
Réactivité. Sang Thrombose Vaisseaux. 6, 449-457.

- DUGAS B., MOSSALAYI M. D., DAMAIS C., AND KOLB J.-P. 1995. *Immunol. Today*. 16, 574-580.
- ENGVALL E., AND PERLMANN P. 1972. *J. Immunol.* 109, 129-135.
- 5       - ESTEBAN F., GOMEZ-JIMENEZ J., MARTIN M. C., RUIZ J. C., NUVIALS X., GARCIA-ALLUT J. L., SAURI R., MURIO J. E., MOURELLE M., SEGUERA R. M., MORA A., PERACAUOLA R., MARGARIT C., AND SALGADO A. 1995. *Trans. Proc.* 27, 2283-2285.
- 10       - EVANS T. G., THAI L., GRANGER D. L., AND HIBBS J. B. H. 1993. *J. Immunol.* 151, 907-915.
- FALKE K., ROSSAINT R., AND PISON V. 1991. *Ann. Rev. Resp. Dis.* 143, A 248.
- FARKAS J., AND MENZEL E. J. 1995. *Biochim. Biophys. Acta.* 1245, 305-310.
- 15       - PARRELL A. J., BLAKE D. R., PALMER R. M. J., AND MONCADA S. 1992. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 1219-1222.
- FEHSEL K., KRONCKE K-D., MEYER K., HUBER H., WAHN V., AND KOLBBACHOFEN V. 1995. *J. Immunol.* 155, 2858-2865.
- 20       - FELDMAN P. L., GRIFFITH O. W., AND STUEHR D. J. 1993. *C & EN.* 26-38.
- FERRANTE R. J., KOWALL N. W., BEAL M. F., RICHARDSON E. P., BIRD E. D., AND MARTIN J. B. *Science.* 230, 561-563.
- 25       - FEURER C., PRENTICE D. E., AND CAMMISULI S. 1985. *J. Neuroimmunol.* 10, 159-166.
- FONTECAVE M., AND PIERRE J.-L. 1995. *Bull Soc Chim Fr.* 131, 620-631.
- 30       - FURCHGOTT R. F., AND ZAWADZKI J. V. 1980. *Nature.* 288, 373-376.
- FURCHGOTT R. F. 1983. *Circ. Res.* 35, 524-526.
- GARTHWAITE J. 1991. *TINS.* 14} 60-67.
- GEFFARD M., BUIJS R. M., SEQUELA P., POOL C. W., AND LE MOAL M. 1984a. *Brain Research.* 294, 161-165.
- 35       - GEFFARD M., SEQUELA P., AND HENRICH-ROCK A. M. 1984b. *Mol. Immunol.* 21, 515-522.

- GEFFARD M., HEINRICH-ROCK A. M., DULUC J., AND SEGUELA P. 1985a. *Neurochem. Int.* 7, 403-413.

- GEFFARD M., HEINRICH-ROCK A. M., DULUC J., AND ROCK A. 1985b. *J. Neurochem.* 44, 1221-1228.

5 - GELLER D. A., LOWENSTEIN C. J., AND SHAPIRO R. A. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 3491-3495.

- GIRARD P., AND POTIER P. 1993. *FEBS.* 320, 7-8.

- GOLDING B., ZAITSEVA M., AND GOLDING H. 1994. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 33-40.

10 - GOODMAN J. W. 1975. (Sela M., ed), pp. 127-187. Academic Press, New York 127.

- GRABOWSKI P. S., ENGLAND A. J., DYKHUIZEN R., COPLAND M., BENJAMIN N., REID D. M., AND RALSTON S. H. 1996. *Arthritis Rheum.* 39, 643-647.

15 - GRANGER D. L., AND LEHNINGER A. L. 1982. *J. Cell. Biol.* 95, 527-535.

- GRANGER D. L., HIBBS J. B., JR., PERFECT, J. R. AND DURACK, D. T. 1988. *J. Clin. Invest.* 81, 1129-1136.

20 - GRAY G. A., SCHOTT C., JULOU-SCHAEFFER G., FLEMING I., PARRATT J. R., AND STOCLET J-C. 1991. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1218-1224.

- GREEN L. C., RUIZ DELUZURIAGA K., WAGNER D. A., RAND W., ISTFAN N., YOUNG V. R., AND TANNENBAUM S. R. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 7764-7768.

25 - GREEN S. J., MELTZER M. S., HIBBS J. B., JR., AND NACY C. A. 1990. *J. Immunol.* 144, 278-283.

- GREEN S. J., NACY C. A., AND MELTZER M. S. 1991. *J. of Leuk. Biol.* 50, 93-103.

- GRISSOM C. B. 1995. *Chem. Rev.* 95, 3-24.

30 - HAGEMAN R. H., AND REED, A. J., 1980. *Meth. Enzymol.* 40, 427-431.

- HALL L. R., AND TITUS R. G. 1995. *J. Immunol.* 155, 3501-3506.

35 - HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C., AND CROSS C. E. 1992. *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598-620.

- HARKINS T. T., AND GRISSOM C. B. 1994. *Science.* 263, 958-960

- HARLOW E., AND LANE D. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- HAUSLADEN A., PRIVALLE CH. T., KENG T.,  
5 DEANGELO J., AND STAMLER J. 1996. Cell. 86, 719-729.
- HECK D. E., LASKINO D. L., GARDNER C. R., AND  
LASKIN J. D. 1992. J. Biol. Chem. 268, 14781-14787.
- HEISS L. N., LANCASTER J. R. JR, CORBETT J.  
A., AND GOLDMAN W. E. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.  
10 91, 267-270.
- HENRY Y., DUCROCQ C., DRAPER J.-C., SERVENT  
D., PELLAT C., AND GUISSANI A. 1991. Eur. Biophys. J. 20,  
1-15.
- HENRY Y., LEPOIVRE M., DRAPIER J.-C. DUCROCQ  
15 C, BOUCHER J.-L., AND GUISSANI A. 1993. FASEB J. 7,  
1124-1134.
- HEVEL J. M., AND MARLETTA M. A., 1992.  
Biochemistry. 31, 7160-7165.
- HIBBS J. B., JR., VAVRIN Z., AND TAINTOR R. R.  
20 1987a. J. Immunol. 138, 550-565.
- HIBBS J. B., JR., TAINTOR R. R., AND VAVRIN Z.  
1987b. Science. 235,473-476.
- HIBBS J. B., JR., TAINTOR R. R., AND VAVRIN  
Z., AND RACHLIN E. M. 1988. Biochem. Biophys. Res.  
25 Commun.157,87-94.
- HIBBS J. B., TAINTOR R. R., VAVRIN Z., GRANGER  
D. L., DRAPIER J.-C., AMBER I. J., AND LANCASTER J. R.,  
JR. 1990. Amsterdam: Elsevier Science Publishers  
BV.189-223.
- HINSENKAMP M., 1990. Thèse d'agrégé de  
30 l'enseignement superieur de L'ULB 381.
- HIRUMI H., AND HIRUMI K. 1989. J. Parasitol.  
75,985-989.
- HOFFMAN R. A., LANGEHR J. M., BILLIAR T. R.,  
35 CURRAN R. D., AND SIMMONS R. L. 1990. J. Immunol. 145,  
22202226.

- HUIE R B, AND PADMAJA S. 1993. Res. Commun. 18, 195-9.

- IALENTI A., MONCADA S., AND DI ROSA M. 1993. Br. J. Pharmacol. 110, 701-706.

5 - IGNARRO L. J., LIPTON H., EDWARDS J. C., BARRICOS W. H., HYMAN A. L., KODOWITZ P. J., AND GREUTTER C. A. 1981. J. Pharmacol. Exp. Ther. 218, 739-749.

- IGNARRO L. J., BUGA G. M., WOOD K. S., BYRNS R. E., AND CHAUDHURI G. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 10 84, 9265-9269.

- IGNARRO L. J. 1989. Circ. Res. 65, 1-21.

- IGNARRO L.I. 1991. Biochem. Pharmacol. 41, 485-490.

- IGNARRO L. J., FUKUTO J. M., GRISCAVAGE J. M., 15 ROGERS N. E., AND BYRNS R. E. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 8103-8107.

- ISCHIROPOULOS H., AND AL-MEHDI A. B. 1995. FEBS Lett. 364, 279-282.

- JACOB CH. AND BELLEVILLE F. 1992. Path. Biol. 20 40, 910-919.

- JACOBS P., RADZIOCH D., AND STEVENSON M. M. 1995. J. Immunol. 155, 5306-5313.

- JAMES S. L., AND GLAVEN J. 1989. J. Immunol. 143, 4208-4212.

25 - JIA L., BONAVENTURA C., BONAVENTURA J., AND STAMLER J. 1996. Nature. 380, 221-226.

- JURETIC A., SPAGNOLI G. C., HORIG H., SHIPMAN R., KOCHER T., SAMIJA M., TURIC M., ELJUGA D., HARDER F., AND HEBERER M. 1995. Immunology. 85, 325-330.

30 - KABAT E. A. 1968. Structural concepts in immunology and immunochemistry. Holt, Reinhart and Winston, Publ., New York.

- KAUR H., AND HALLIWELL B. 1994. FEBS Lett. 350, 9-12.

35 - KEANEY, J. F. JR., SIMON D. I., STAMLER J. S., JARAKI O., SCHARFSTEIN J., VITA J A., AND LOSCALZO J. 1993. J. Clin. Invest. 91, 1582-1589.

- KEANEY J. F., PUYANA J. C., FRANCIS S.,  
LOSCALZO J. F., STAMLER J. S., AND LOSCALZO J. 1994.  
Circ. Res. 74, 1121-1125.
- KELLER R., KEIST R., WECHSLER A., LEIST T. P.,  
5 AND VAN DER MEIDE P. H. 1990. Int. J. Cancer. 46, 682-686.
- KELM M., AND SCHRADER J. 1990. Circ. Res. 66,  
1561-1575.
- KHARITONOV V. G., SUNDQUIST A. R., AND SHARMA  
V. S. 1995. J. Biol. Chem. 270, 28158-28164.
- 10 - KILBOURN R. G., JUBRAN A., AND GROSS S. S.  
1990. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 1132-1138.
- KNOWLES R. G., AND MONCADA S. 1992. TIBS. 17,  
399-402.
- KOFLER H., SCHNEGG I., GELEY S., HELMBERG A.,  
15 VARGA J. M., AND KOFLER R. 1992. Mol. Immunol. 29,  
161-166.
- KOH J. Y., PETERS S., AND CHOI D. W. 1986.  
Science. 234, 73-76.
- KOH J. Y., AND CHOI D. W. 1988. J. Neurosci.  
20 8, 2153-2163.
- KOHLER G., AND MILSTEIN C. 1975. Nature. 256,  
495-497.
- KOPPENOL W. H., MORENO J. J., PRYOR W. A.,  
ISCHIROPOULOS H., AND BECKMAN J. S. 1992. Chem. Res.  
25 Toxicol. 5, 834-842.
- KOPROWSKI H., ZHENG Y. M., HEBER-KATZ E.,  
FRASER N., RORKE L., FU Z. F., HANLON C., AND DIETZSCHOLD  
B. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 3024-3027.
- KWON N. S., STUEHR D. J., AND NATHAN C. F.  
30 1991. J. Exp. Med. 174, 761-768.
- LACAZE-MASMONTEIL T. 1992. Medicine/Sciences.  
8, 843-845.
- LAGIER B., CHARRIER M. C., GEFFARD M., AND  
DOUTREMEPUICH C. 1992. Thrombosis Res. 65, 275280.
- 35 - LAMAS S., MARSDEN P. A., LI G. K., TEMPST P.,  
AND MICHEL T. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89,  
6348-6352.



- LANCASTER J. R., AND HIBBS J. B. JR. 1990. Proc. natl., Acad. Sci. USA. 87, 1223-1227.

- LANCASTER J. R. 1992. American Scientist. 80, 248-259.

5 - LANDER H. M., OGISTE J. S., PEARCE S. F., LEVI R., AND NOVOGRODSKY A. 1995. J. Biol. Chem. 270, 7017-7020.

10 - LANDSTEINER K. 1945. The specificity of serological reactions, second edition. Harvard university Press, Cambridge MA.

- LANE R. D. 1985. J. Immunol. Methods. 81, 223-228.

- LANHAM S. M. 1968. Nature (Lond.). 218, 1273-1274.

15 - LEE S. C., DICKSON D. W., LIU W., AND BROSNAN C. F. 1993. J. Neuroimmunol. 6, 19-4.

- LEPOIVRE M., BOUDBIB F., AND PETIT J. F. 1989. Cancer reas. 49, 1970-1976.

20 - LEPOIVRE M., CHANAIS B., YAPO A., LEMAIRE G., THELANDER L., AND TENU J.-P. 1990. J. Biol. Chem. 265, 14143-14149.

- LEPOIVRE M., FLAMAN J-M., AND HENRY Y. 1992. J. Biol. Chem. 267, 22994-23000.

25 - LEVINE S. 1986. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 45, 247-257.

- LIEW F. Y., MILLOTT S., PARKINSON C., PALMER R. M., AND MONCADA S. 1990. J. Immunol. 144, 4794-4797.

- LIEW F. 1991. Role of cytokines in killing of intracellular pathogens. Immunol. Lett. 30, 193-198.

30 - LEW F. Y. AND COX F. E. G. 1991. Immunol. Today. 7, A17-A21.

- LIN J.-Y., SEGUIN R., KELLER K., AND CHADEE K. 1995. Immunology. 85, 400-407.

35 - LINDSAY R. M., SMITH W., ROSSITER S. P., AND McINNIYRE M. A. 1995. Diabetes. 44, 356-358.

- LIPTON S. A., CHOI Y., PAN Z., LEL S., CHEN H. V., SUCHER N. J., LOSCALZO J., AND STAMLER J. S. 1993. *Nature*. 364, 626-632.
- LIPTON S. A., AND GENDELMAN H. 1995. *N. Engl. J. Med.* 332, 934-940.
- LOPEZ R. L., PETERS G. J., VAN LOENEN A. C., PIZAO P. E., VAN R1;JSWIJK R. E. N., WAGSTAFF J., AND PINEDO H. M. 1992. *Int. J. Cancer*. 51, 921-926.
- LOSER CH., FOLSCH U. R., PAPROTNY CH., AND CREUTZFELDT W. 1990. *Cancer*. 65, 958-966.
- LOWENSTEIN C. J., AND SNYDER S. H. 1992. *Cell*. 70, 705-707.
- MAEJI N. J., TRIBBICK G., BRAY A. M., AND GEYSEN H. M. 1992. 146, 83-90.
- MANZONI O., PREZEAU L., MARIN P., DESAGHER S., BOCKAERT J., AND FAGNI L. 1992. *Neuron* 8, 653-662.
- MARLETTA M. A., YOON P. S., IYENGAR R., LEAF C. D., AND WISHNOK J. S. 1988. *Biochemistry*. 27, 8706-8711.
- MARLETTA M. A. 1993. *J. Biol. Chem.* 268, 122231-199934.
- MARLETTA M. A. 1994. *Cell*. 78, 927-930.
- MAUEL J. 1993. Le NO comme molécule effectrice dans la défense antiinfectieuse. Communication orale lors du premier Forum multidisciplinaire sur le NO. Paris. Janvier 1993.
- MAYER B., KLATT P., WERNER E. R., AND SCHMIDT K. 1994. *Neuropharmacology*. 33, 1253-1259.
- MCCARTNEY-FRANCIS N., ALLEN J. B., MIZEL D. E., ALBINA J. E., XIE Q.W., NATHAN C. F., AND WAHL S. M. 1993. *J. Exp. Med.* 178, 749-754.
- MCDANIEL M. L., KWON G., HILL J. R., MARSHALL C. A., AND CORBETT J. A. 1996. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 24-32.
- MELDRUM B., AND GARTHWAITE J. 1990. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 379387.

- ME-MER U. K., ANKARCORONA M., NICOTERA P., AND  
BRUNE B. 1994. FEBS Letters. 355, 23-26.

- MILLS C. D. 1991. Molecular basis of  
"suppressor" macrophages: arginine metabolism via the  
5 nitric oxide pathway. J. Immunol. 146, 2719-2723.

- MIR L. M., ORLOWSKI, S., BELEHRADEK, J. AND  
PAOLETTI, C. 1991. Eur. J. cancer. 27, 68-72.

- MYSKO T. P., MOOREW. M., AND KASTEN T. P.  
1993. Eur. J. Pharmacol. 233, 119-125.

- MIZUTANI R., MIURA K., NAKAYAMA T., SHMADA I.,  
ARATA Y., AND SATOW Y. 1995. J. Mol. Biol. 254, 208-222.

- MNAIMNEH S. 1993. Approche immunologique  
dirigée contre des conjugués NO. Diplôme d'Etude  
Approfondies de Neurosciences et Pharmacologie, Université  
15 de Bordeaux II.

- MOHR S., STAMLER J. S., AND BRUNE B. 1996. J.  
Biol. Chem. 271, 4209-4214.

- MOILANEN E., AND VAPAATALO H. 1995. Ann. Med.  
27, 359-367.

- MONCADA S., PALMER R. M. J., AND HIGGS E. A.  
20 1991. Pharmacol Rev. 43, 109-142.

- MONS N., AND GEFFARD M. 1987. J. Neurochem,  
48, 1826-1833 .

- MORRIS C. J., EARL J. R., TRENAM C. W., AND  
25 BLANKE D. 1995. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 27, 109-122.

- MOSMAN T. R., AND COFFMAN R. L. 1989. Am. Res.  
Immunol. 7, 145-173.

- MIRABET O., MESSIER C., MONS N., DESTRADE C.,  
AND GEFFARD M. 1991. J. Hirnforsch. 32, 627-633.

- MURRAY H. W., RUBIN B. Y., AND ROTHERMEL C. D.  
30 1983. J. Clin. Invest. 72, 1506-1510.

- NATHAN C. 1992. FASEB J. 6, 3051-3064.

- NATHAN C. AND XIE Q.-W. 1994. J. Biol. Chem.  
269, 13725-13728.

- NGUYEN T., BRUNSON D., CRESPI C. L., PENMAN B.  
35 W., WISHNOK J. S. AND TANNENBAUM S. R. 1992. Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA. 89, 3030-3034.

- NOIREAU F., PAINDAVOINE P., LEMESRE J. L.,  
TOUDIC A., PAYS E., GOUTEUX J. P., STEINERT M., AND FREZIL  
J. L. 1989. Tropical Medicine and parasitology. 40, 9-11.
- NOSSOL B., BUSE G., AND SILNY J. 1993.  
5 Bioelectromagnetics. 14, 361-372.
- NUSSLER A. K., AND BILLIAR T. R. 1993. J.  
Leukoc Biol. 54, 171-178.
- NUSSLER A. K., BILLIAR T. R., AND SIMMONS R.  
L. 1995. Prog. Surg. Basel, Karger. 20, 33-50.
- OBERG F., BLOTTING J., AND NILSSON K. 1993.  
10 Trans. Proc. 25, 2044-2047.
- OFFNER H., HASHIM G. A., CELNIK B., GALANG A.,  
LI X., BURNS F. R., SHEN N., HEBER-KATZ E., AND VANDERBARK  
A. A. 1989. J. Exp. Med. 170, 355-367.
- OSI S. 1995. Keio J. Med. 44, 53-61.
- OKA M., YOSHISADA Y., ITO Y., AND TAKAYANAGI  
T. 1988. Microbiology and Immunology. 32, 1175-1177.
- OLNEY J. W. 1991. Ascher P., Choi D. W. and  
Christen Y. (Eds.) SpringerVerlag, 77-101.
- OLSSON T. 1995. Immunol. Rev. 144, 245-268.
- OLSSON T., BAKHIET M., AND EDLUND C. 1991.  
20 Eur. J. Immunol. 21, 2447-2454.
- OYANAGUI Y. 1994. Life Sci. 54, 285-289.
- PACELLI R., WINK D. A., COOK J. A., KRISHNA M.  
C., DEGRAFF W., FRIEDMAN N. TSOKOS M, SAMUNI A., AND  
25 MITCHELL J. B. 1995. J. Exp. Med. 182, 1469-1479.
- PALMER R. M. J., FERRIGE A. G., AND MONCADA S.  
1987. Nature (Lond.). 327, 524-526.
- PALMER R. M. J., ASHTON D. S., AND MONCADA S.  
30 1988. Nature (Lond.). 333, 664-666.
- PALMER R. M. G., AND MONCADA S. A. 1989.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 158, 348-352.
- PALMER R. M. G., BRIDGE L., FOXWELL N. A., AND  
MONCADA S. 1992. Br. J. Pharmacol. 105, 11-12.
- PALMER R. M. J., KICKERY M. S., CHARLES I. G.,  
35 MONCADA S. M., AND BAYLISS T. 1993. Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 193, 398-405.

- PANITCH H., AND CICCONE C. 1981. Ann. Neurol. 9, 433-438.
- PELLAT C., HENRY Y., AND DRAPIER J.-C. 1990. Biochem. Biophys. Res. Commun. 166, 119-125.
- 5 - PEPKE-ZABA J., HIGENBOTTAM T. W., TUAN DINH-XUAN A., STONE D., AND WALLWORK J. 1991. Lancet. 338, 1173-1174.
- PETERS W., AND GILLES H. M. 1982. Atlas en couleurs de Médecine tropicale et de Parasitologie. 10 Maloine s. a. éditeur.
- PETROS A., LAMB G., LEONE A., MONCADA S., BENNETT D., AND VALLANCE P. 1994. Cardiovascular Res. 28, 34-39.
- POLMAN C. H., MATTHAEI I., DE GROOT C. J., 15 KOETSIER J. C., SMINIA T., AND DIJKSTRA C. D. 1988. J. Neuroimmunol. 17, 209-216.
- POSER C. M. 1992. J. Neurol. Sci. 107, 127-140.
- POTTER M. 1976. Tumors of immunoglobulins producing cells. The immune system, 17 Colloquium Mosback. 20
- RADII R., BECKMAN J. S., BUSH K. M. AND FREEMAN B. A. 1991a. J. Biol. Chem. 266, 4244-4250.
- RADII R., BECKMAN J. S., BUSH K. M., AND FREEMAN B. A. 1991b. Arch. Biochem. Biophys. 288, 481-487.
- 25 - RADOMSKI M. W., PALMER R. M. J., AND MONCADA S. 1987. Lancet. ii, 1057.
- RAJFER J., ARONSON W. J., BUSH P. A., DOREY F. J., AND IGNARRO L. J. 1992. N. Engl. J. Med. 326, 90-94
- REES D. D., CELLEK S., PALMER R. M. J., AND 30 MONCADA S. 1990. Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 541-547.
- REIMERS J. L., BJERRE U., MANDRUP-POULSEN T., AND NERUP J. 1994. Cytokine. 6, 512-520.
- REINER S. L., AND LOCKSLEY R. M. 1992. 35 Infectious Agents and Disease. 1, 33-42.
- RENGASAMY A., AND JOHNS R. A. 1993. Mol. Pharmacol. 44, 124-128.

- ROGERS N. E., AND IGNARRO L. I. 1992. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 242-249.
- ROY B., LEPOIVRE M., HENRY., AND FONTECAVE M. 1995. Biochemistry. 34, 5411-5418.
- 5       - RUSKIN I., AND REMINGTON J. S. 1968. Antimicrobial Agents and Chemotherapy G. L. Hobby, ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 474.
- SALVEMINI D., MISKO T. P., MASFERRER J. L., SEIBERT K., CURRIE M. G., AND NEEDELMAN P. 1993. Proc.
- 10       Natl. Acad. Sci USA. 90, 7240-7244.
- SARIH M., SOWANNAVONG V., AND ADAM A. 1993. Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 503-508.
- SAVILLE B. 1958. Analyst. 83, 670-672.
- SCAIANO J. C., MOHTAT N, COZENS F. L., McLEAN
- 15       J. AND THANSANDOTE A. 1994. Bioelectromagnetics. 15, 549-554,
- SCHARFSTEIN J. S., KEANEY J. F., JR., SLIVKA A., WELCH G. N., VITA. J. A STAMLER J. S., AND LAOSCALSO J. 1994.J. Clin. Invest. 94, 1432-1439.
- 20       - SCHLEIFER, K. W., AND MANSFIELD J. M. 1993. J. Immunol. 151, 5492-5503.
- SCHLEIFER, K. W., FILUTOWICZ H., SCHOPF L. R., AND MANSFIELD J. M. 1993. J. Immunol. 150, 2910-2919.
- SCHMIDT H. H. H. W. 1992. FEBS Lett. 307,
- 25       102-107.
- SCHMIDT H. H. H. W., WARNER T. D., ISHII K., SHENG H., AND MURAD F. 1992. Science. 255, 721-723.
- SCHMIDT H. H. W., AND WALTER U. 1994. NO at Work. Cell. 78, 919-925.
- 30       - SHERMAN M. P., GRISCAVAGE J. M., AND IGNARRO L. J. 1992. Med. Hyp. 39, 143-146.
- SHULMAN M., WILDE M. D., AND KOHLER G. 1978.Nature. 276, 269-270.
- SIMON D. I., STAMLER J. S., JARAKI O., KEANEY
- 35       J. F., OSBORNE J. A., FRANCIS S. A., SINGEL D. J., AND LOSCALZO J. 1993. Atherosclerosis and Thrombosis. 13, 791-799.

- SNYDER S., AND BREDT D. 1992. Les fonctions biologiques du monoxyde d'azote. *Pour la Science*. 177, 70-77.

- SOUTHAN G J., SZABO C., AND THIEMERMANN C. 1995. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. 114, 510-516.

- STADLER J., STEFANOVIC-RACIC M., BILLIAR T. R., CURRAN R. D., MCINTYRE L. A., GEORGESCU H. I., SIMMONS R. L., AND EVANS C. H. 1991. *J. Immunol.* 147, 3915-3920.

- STADLER J., HARBRECHT B. G., AND DISILVIO M. 1993. *J. Leukocyte Biol.* 53, 165-172.

- STAMLER J. S., SINGEL D. J., AND LOSCALZO J. 1992a. *Science*. 258, 1898-1902.

- STAMLER J. S., SIMON D. I., JARAKI O., OSBORN J. A., SIMON D. I., KEANEY J., VIIA J., SINGEL D., VALERI C. R., AND LOSCALZO J. 1992b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 7674-7677.

- STAMLER J. S., SIMON D. I., OSBORNE J. A., MULLINS M. E., JARAKI O. MICHEL T., SINGEL D. J., AND LASCALZO J. 1992c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 444-448.

- STAMLER J. S., SIMON D., JARAKI O., OSBORNE J. A., FRANCIS S., MULLINS M., SINGEL D., AND LASCALZO J. 1992d. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*. 89, 8087-8091.

- STAMLER J. 1994. *Cell*. 78, 931-936.

- STEFANOVIC-RACIC M., STADLER J., GEORGESCU H. I., AND EVANS C. H 1992. (abstract). *Trans. Orthop. Res. Soc.* 17, 228.

- STEFANOVIC-RACIC M., STADLER J., AND EVANS C. H. 1993. *Arthritis Rheum.* 36, 1036-1043.

- STERNBERG J. M., MABOTT N. A. SUTHERLAND I. A., AND LIEW F. Y. 1994. *INFECT. IMMUN.* 62, 2135

- STERNBERG J. M., AND MABOTT N. A. 1996. *Eur. J. Immunol.* 26, 539-543.

- STUEHR D. J., AND MARLETTA M. A. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82, 7738-7742.

- STUEHR D. J., AND MARLETTA M. A. 1987a. J. Immunol. 139, 518-525.
- STUEHR D. J., AND MARLETTA M. A. 1987b. Cancer Res. 47, 5590-5594.
- 5       - STUEHR D. J., GROSS S. S., SAKUMA I., LEVI R., AND C. F. NATHAN. 1989. J. Exp. Med. 169, 1011-1020.
- STUEHR D. J., AND NATHAN. C. F. 1989. J. Exp. Med. 169, 1543-1555.
- STUEHR D. J., AND GRIFFITH O. W. 1992. Adv. 10 Enzymol. 65, 287-346.
- TALBOT P. 1995. Médecine/Sciences. 11, 837-843.
- THIEMERMANN C., AND VANE J. 1990. Eur. J. Pharmacol. 128, 591-595.
- 15       - TRAYLOR T. G., AND SHARMA V. S. 1992. Biochemistry. 31, 2847-2849.
- TUFFET S., DE SEZE R., MOREAU J. M., VEYRET B. 1993. Bioelectrochem. Bioenerg. 30, 151-160.
- VAITUKAITIS J. L., ROBIN J. B., NIESCHLONG E., 20 AND ROSS G. T. 1971. J. Clin. Endocr. 33, 988-991.
- VALLANCE P., AND MONCADA S. 1993. New Horizons. 1, 77-86.
- VAN DAM A. M., BAUER J., MAN-A-HING W. K. H., MARQUETTE C., TILDERS F. J. H., AND BERKENBOSCH F. 1995. 25 J. Neuroscience. Res. 40. 251-260.
- VAN DER VLET A. O'NEILL C. A., HALLIWELL B., CROSS C. E., AND KAUR H. 1994. FEBS Lett. 339, 89-92.
- VANSTERKENBURG E. L. M., WILTING J., AND JANSSEN L. H. M. 1989. Biochem. Pharmacol. 38, 3029-3035.
- 30       - VILLAS P. A., DRONSFIELD M. J., AND BLANKENHORN E. P. 1991. Clin. Immunol. and Immunopath. 61, 29-40.
- VINCENDEAU P., CARISTAN A., AND PAUTRIZEL R. 1981. Infect. Immun. 34, 3783-3781.
- 35       - VINCENDEAU P., GUILLEMAIN B., DAULOUEDE S., AND RIPERT C. 1985. International J. Parasitol. 16, 387-390.



- VINCENDEAU P., DAULOUEDE S., AND VEYRET B.  
1989. *Parasitology*. 98, 253-257.

- VINCENDEAU P., AND DAULOUEDE S. 1991. *J. Immunol.* 146, 4338-4343.

5 - VINCENDEAU P., DAULOUEDE S., VEYRET B., DARDE M.-L., BOUTEILLE B., AND LEMERSRE J.-L. 1992. *Experimental Parasitology*. 75, 353-360.

10 - VOULDOUKIS I., RIVEROSMORENO V., DUGAS B., OUAZ F., BECHEREL P., DEBRE P., MONCADA S., AND MOSSALAYI D. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7804-7808.

- WAGNER J. G., GANEY P. E., AND ROTH R. A. 1996. *Hepatology*. 23, 803810.

15 - WALLECZEK J. 1995. *Advances in Chemistry*. No 250 (Blanck, M, Ed), American Chemical Society, pp. 395-420.

- WEI X. Q., CHARLES I. G., SMITH A., URE J., FENG G. J., HUANG F. P., >(U D., MULLER W., MONCADA S., AND LIEW F. Y. 1995. *Nature*. 375, 408411.

20 - WEINBERG J. B., GRANGER D. L., PISETSKY D. S., SELDIN M. F., MISUKONIS M. A., MASON S. N., PIPPEN A. M., RUIZ P., WOOD E. R., AND GILKESON G. S. 1994. *J. Exp. Med.* 179, 651-660.

- WELSH N., EIZIRIK D. L., AND SANDLER S. 1994. *Autoimmunity*. 18, 285-290.

25 - WERNER-FELMAYER G., WERNER E., FUCHS D., HAUSEN A., MAYER B., REIBNEGGER G., WEISS G., AND WATCHTER H. 1993. *Biochem. J.* 289, 357-361.

30 - WINK D. A., HANBAUER I., KRISHNA M., DE GRAFF W., GAMSON J., AND MITCHELL J. B. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 90, 9813-9817.

- WINYARD P. G., PERRETT D., HARRIS G., AND BLAKE D. R. 1992. *Biochemistry of Inflammation*. Whicher and Evans Ed. p 109.

35 - YUHASZ S. C., PARRY C., STRAND M., AND AMZEL L. M. 1995. *Mol. Immunol.* 32, 1145-1155.

- YUIN C., BASTIAN N., SMITH J., HIBBS J., AND SAMLOWSKI W. 1993. *Cancer Res.* 53, 5507-5511.

- ZHAO B. L., WANG J. C., HOU J. W., AND XIN W.  
J. 1996. Cell Biol. Int. 20, 343-350.

- ZHUO M., SMALL S. A., KANDEL E. R., AND  
HAWKINS R. D. 1993. Science. 260, 1946-1950.

## Revendications

1) Anticorps purifié reconnaissant spécifiquement une protéine nitrosylée.

5

2) Anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite protéine est un transporteur de NO.

10

3) Anticorps selon les revendications 1 ou 2, reconnaissant spécifiquement une albumine nitrosylée.

15

4) Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est un anticorps polyclonal.

20

5) Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est un anticorps monoclonal.

6) Ensemble d'anticorps selon la revendication 4 ou 5.

25

7) Immunogène pour la préparation d'anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est constitué par une protéine porteuse nitrosylée dont la séquence possède un site de nitrosylation, ou par un acide aminé nitrosylé couplé à une protéine porteuse.

30

8) Immunogène selon la revendication 7, caractérisé en ce que le site de nitrosylation ou l'acide aminé est choisi parmi la tyrosine, la cystéine éventuellement acétylée ou le tryptophane.

35

9) Immunogène selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la protéine porteuse est une albumine.

5                   10) Procédé de préparation d'un immunogène selon l'une quelconque des revendications 8 à 9, caractérisé en ce que l'on couple un acide aminé à une protéine porteuse, puis en ce que l'on nitrosyle le conjugué obtenu par un composé donneur de NO.

10                   11) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend comme principe actif un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou un ensemble d'anticorps selon la revendication 6  
15                   avantageusement dispersé dans un véhicule ou des excipients pharmaceutiquement acceptables.

                  12) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou d'un ensemble  
20                   d'anticorps selon la revendication 6 ou d'une composition selon la revendication 11, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter ou prévenir une pathologie dans lesquelles NO, ses dérivés ou conjugués sont  
implicués.

25                   13) Procédé de détection *in vitro* de protéines nitrosylées dans un échantillon biologique comprenant au moins les étapes suivantes :

                  - la mise en contact de cet échantillon avec  
30                   au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou un ensemble d'anticorps selon la revendication 6, éventuellement marqués, dans des conditions permettant la formation de complexes immunologiques;

35                   - la détection d'un complexe immunologique antigène-anticorps par des méthodes physiques ou chimiques.

14) kit pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend :

5                   - au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou un ensemble d'anticorps selon la revendication 6, éventuellement marqués,

10                   - des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique entre ledit anticorps et les protéines nitrosylées éventuellement présentes dans un échantillon biologique;

                  - éventuellement un ou plusieurs réactifs de détection éventuellement marqués aptes à réagir avec les complexes immunologiques éventuellement formés;

15                   - éventuellement un ou plusieurs réactifs biologiques de référence et de contrôle.

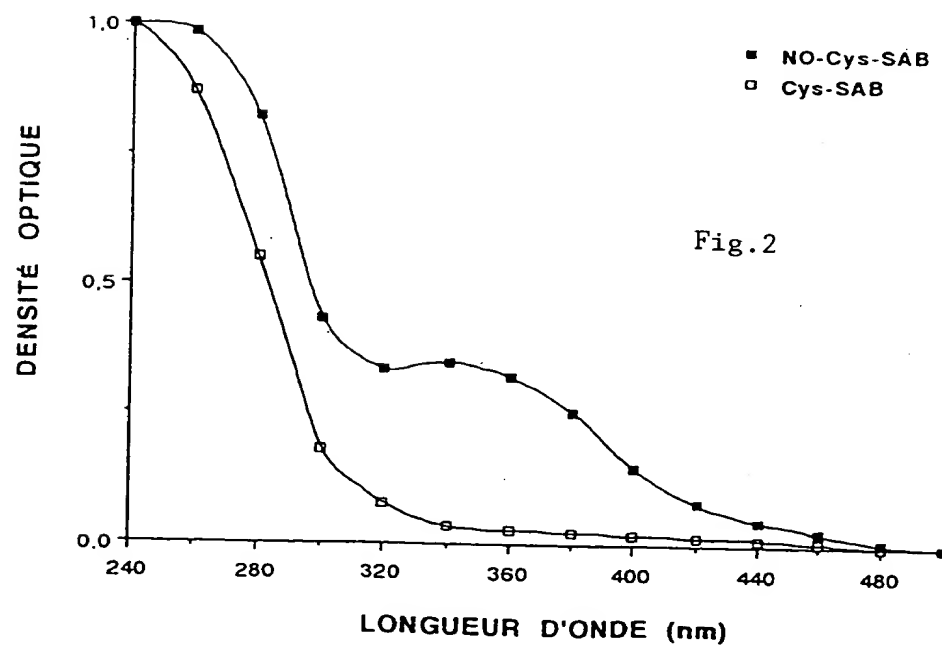
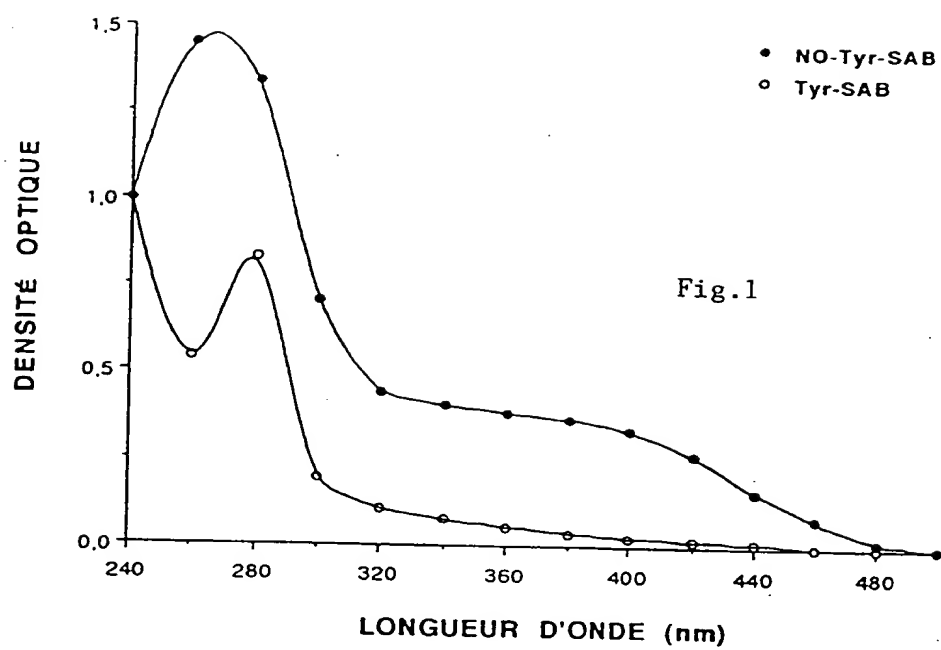


Fig.3

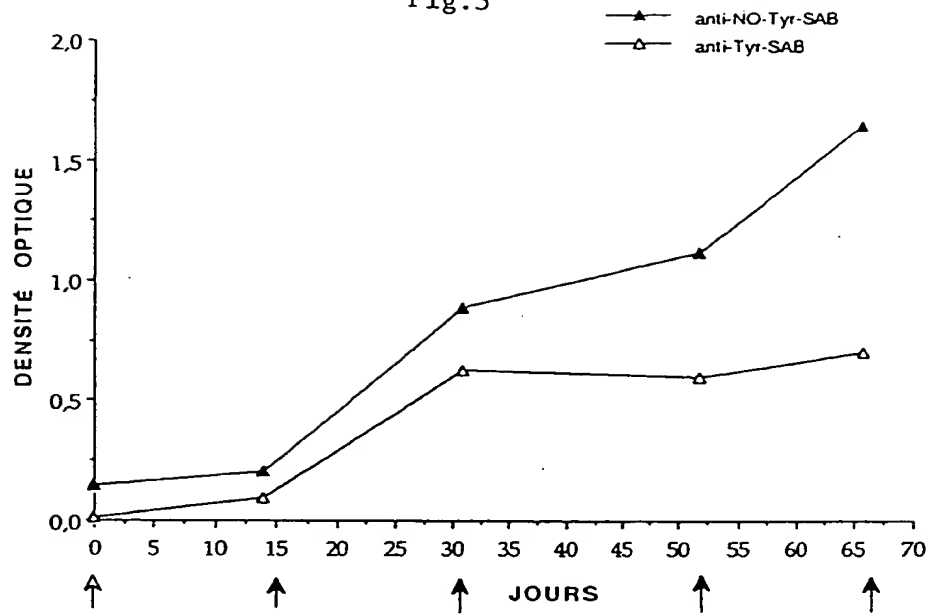


Fig.4

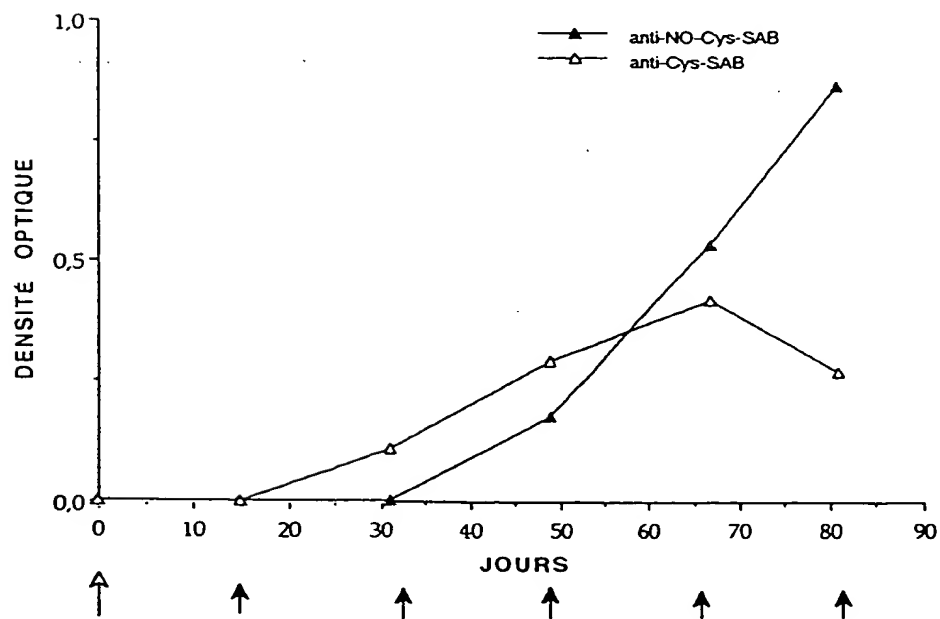


Fig.5

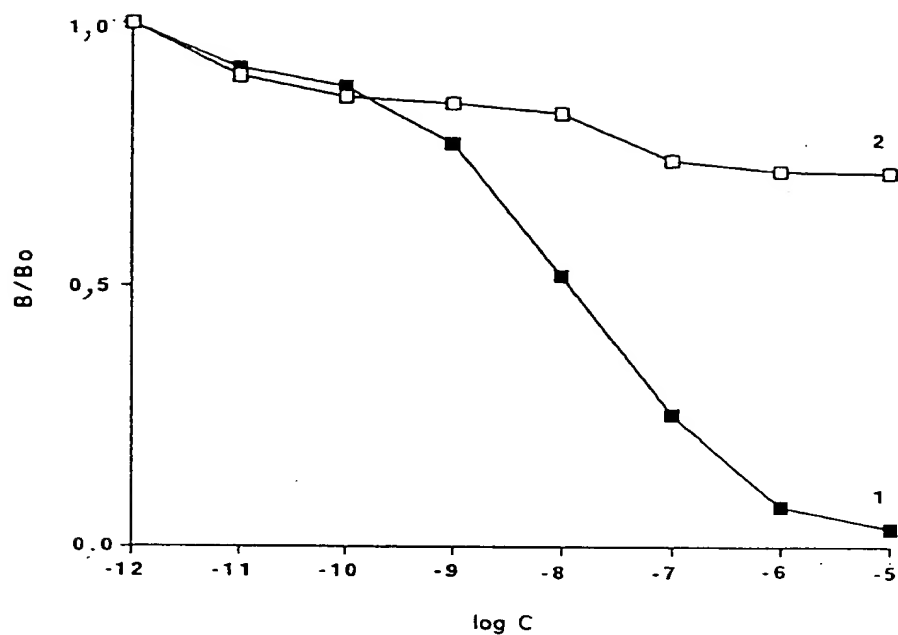
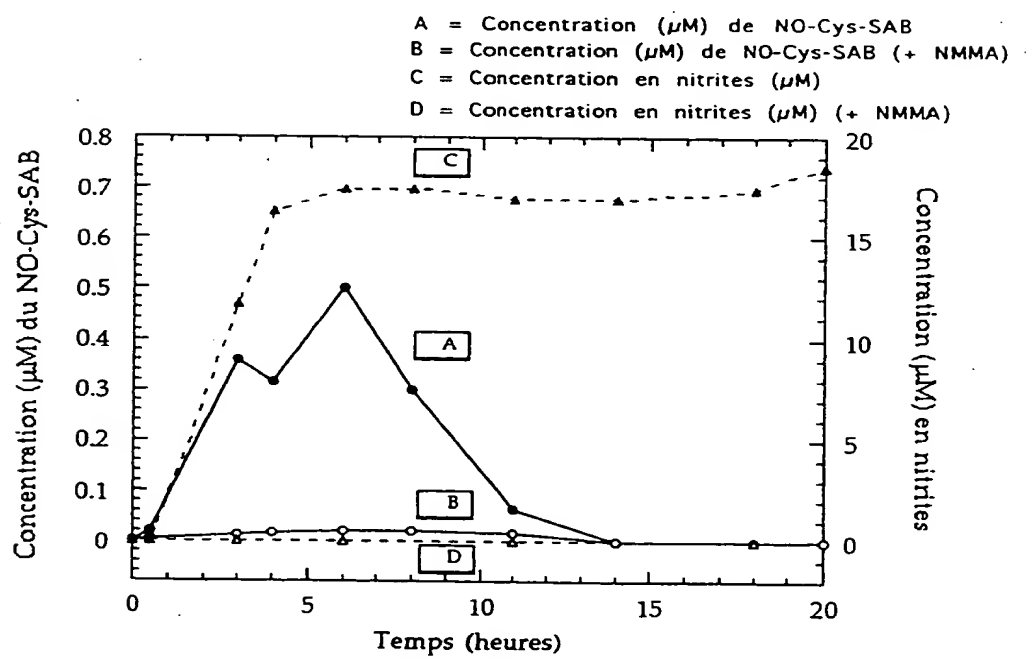


Fig.6





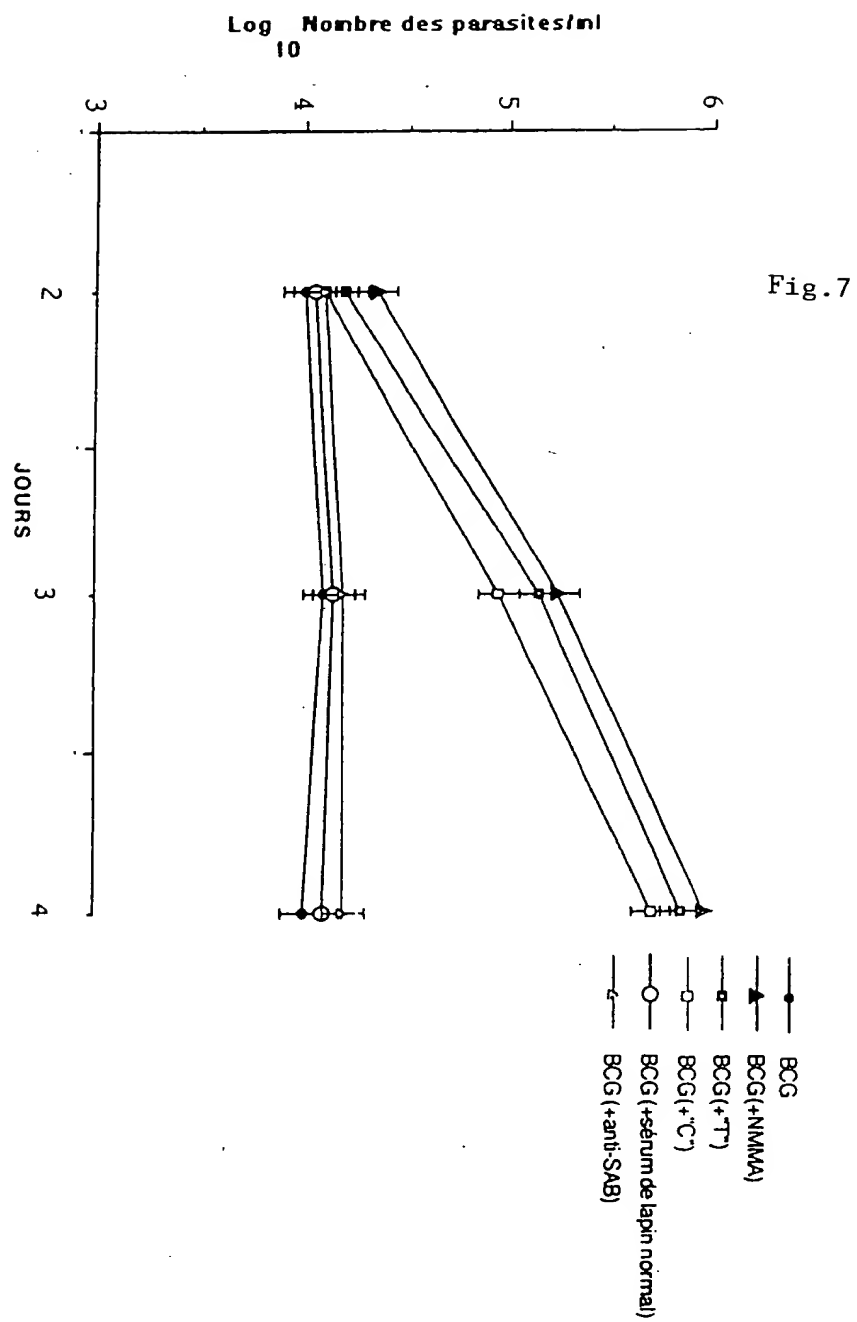


Fig.8

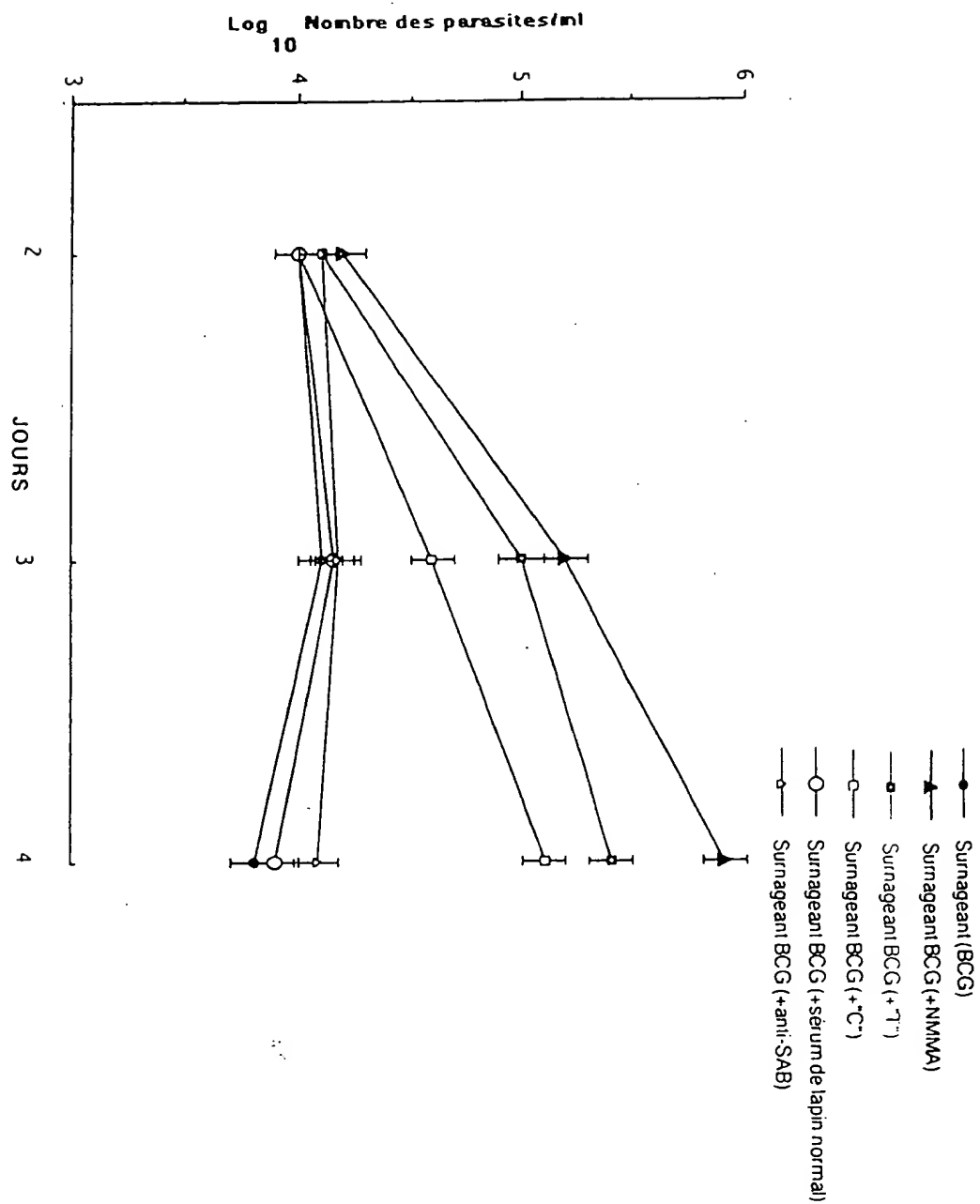


Fig.9

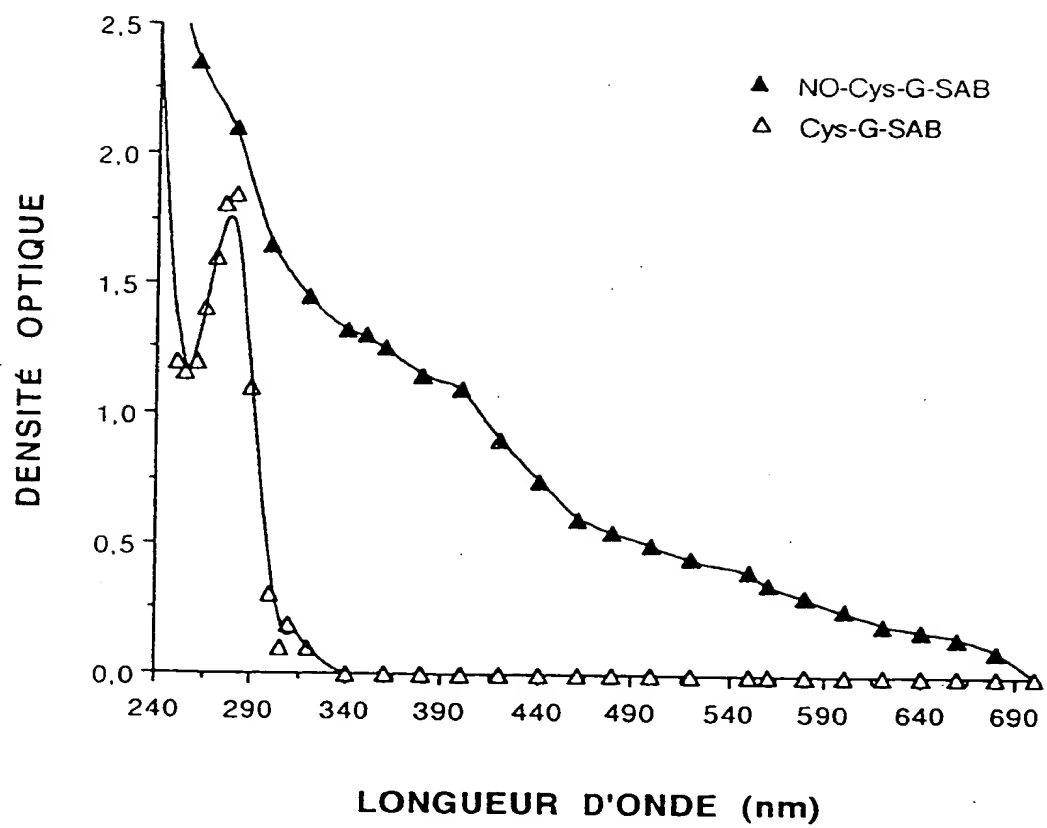


Fig.10

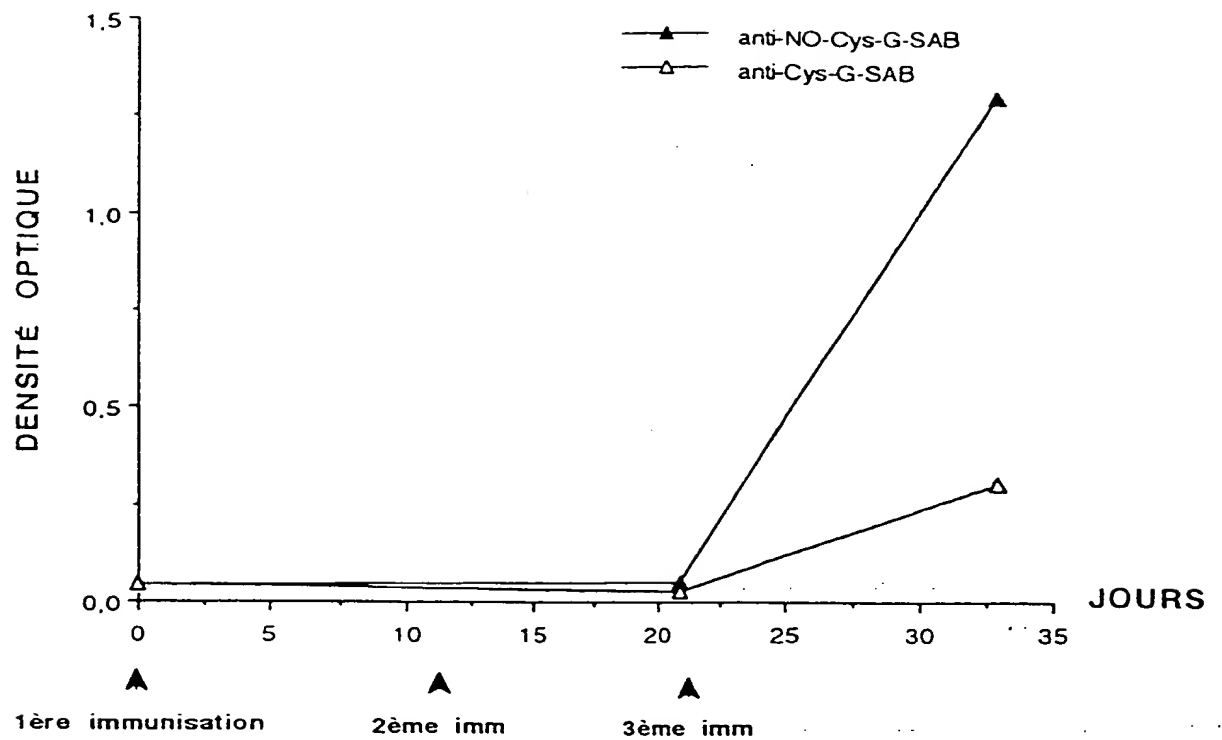


Fig.11

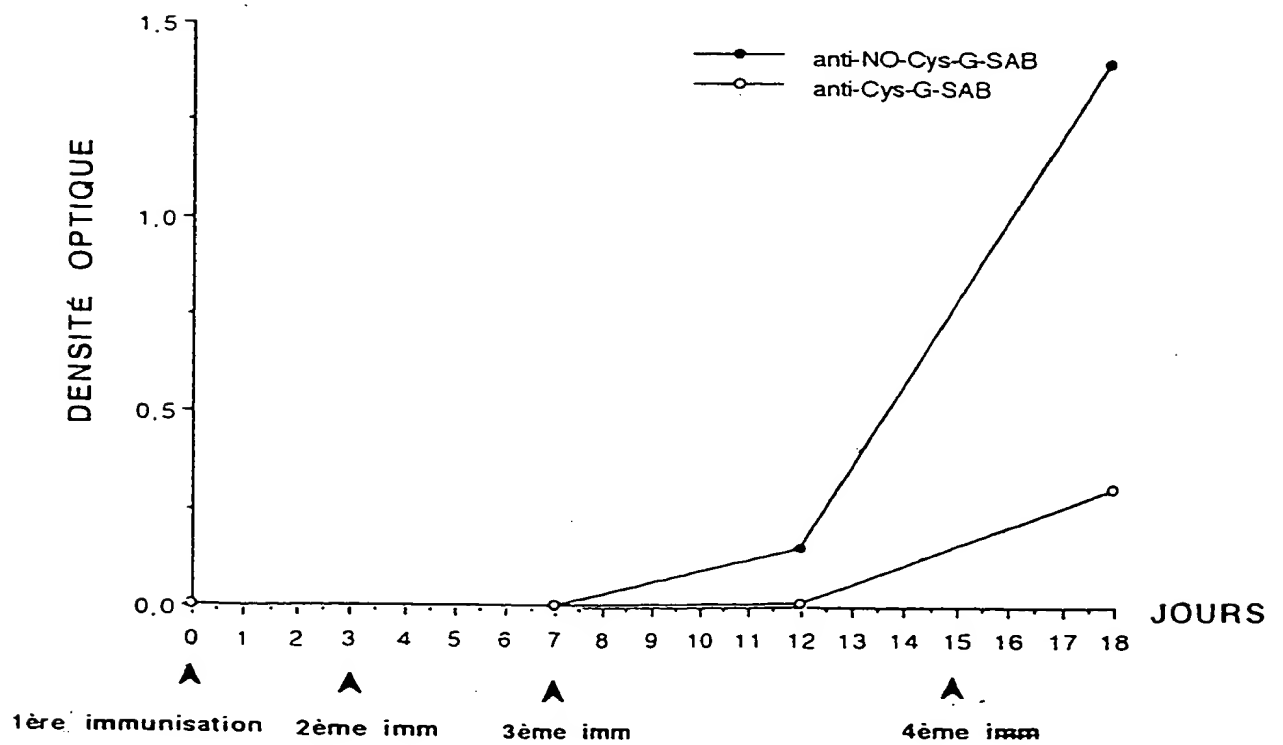


Fig.12

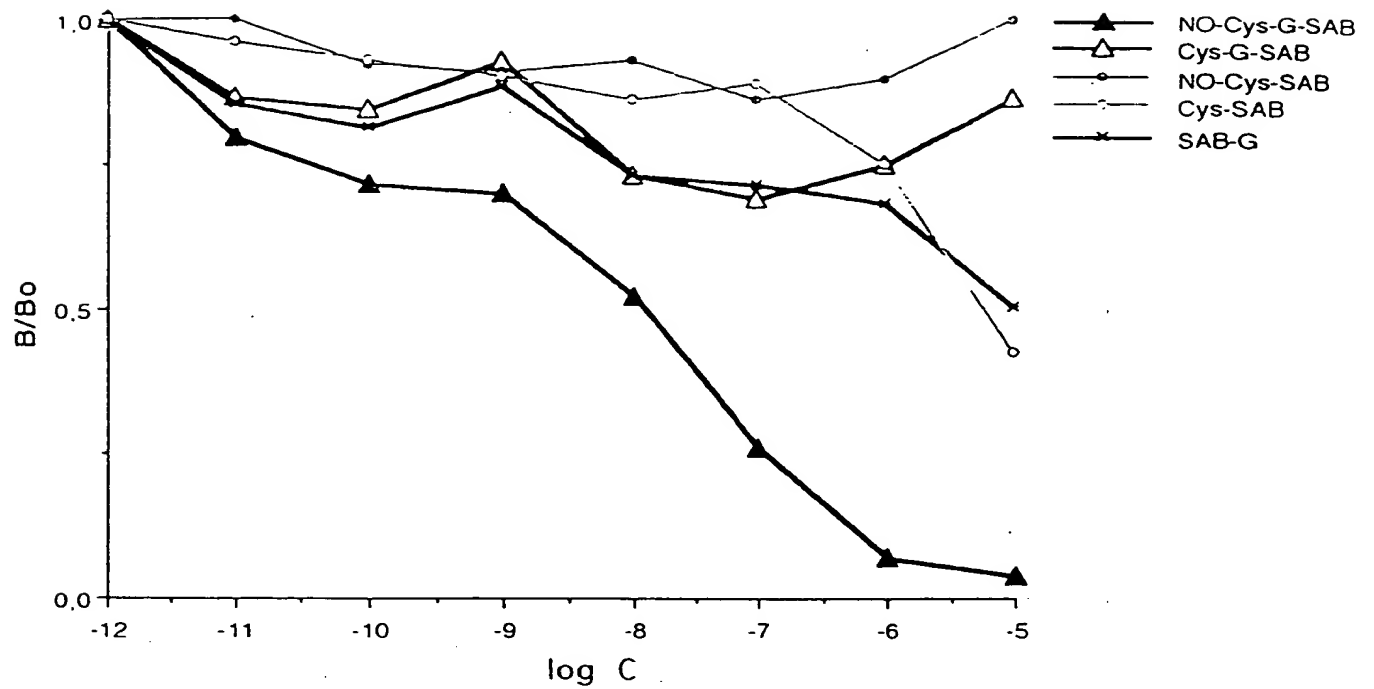


Fig.13

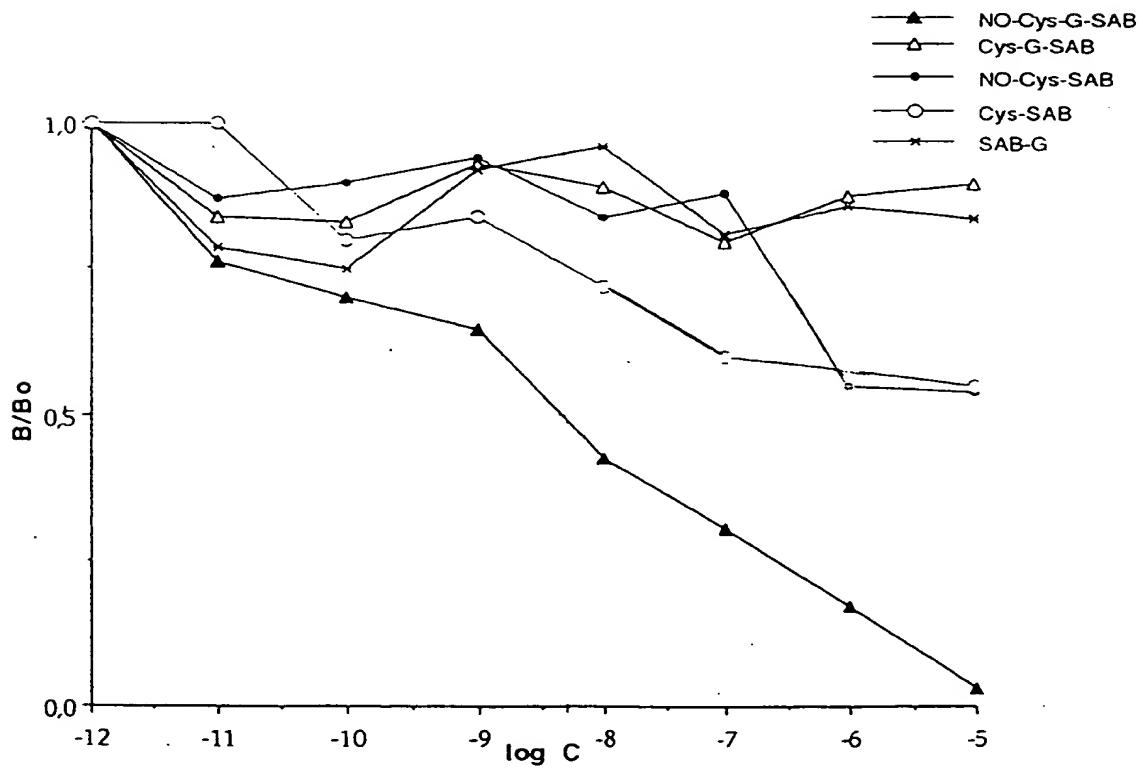




Fig.15

MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIQUE A FORT GROSSESSEMENT  
(X 100)

Photo IV - 1.  
"Ac monoclonal + macrophages BCG"

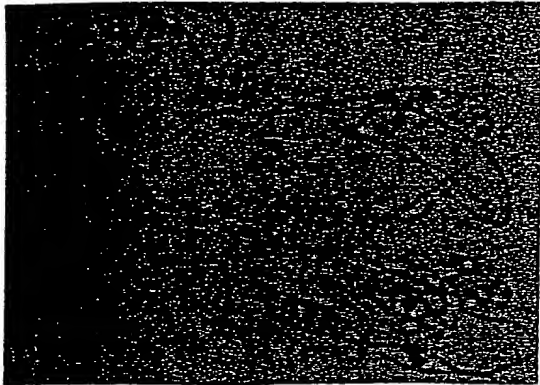


Photo IV - 2.  
"Ac monoclonal +  
macrophages BCG + NMMA"

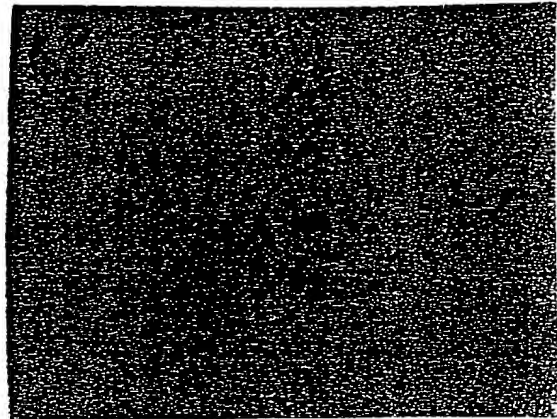


Photo IV - 3.  
"Sérum de souris normale +  
macrophages BCG"

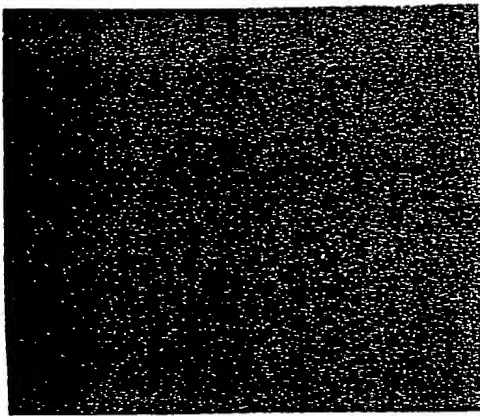


Photo IV - 4.  
"Ac "C" + macrophages BCG"



Photo IV - 5. "Ac "T" + macrophages BCG"

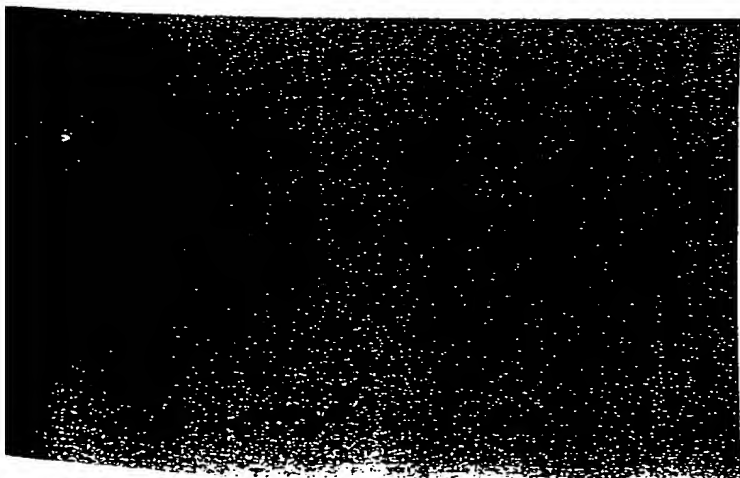
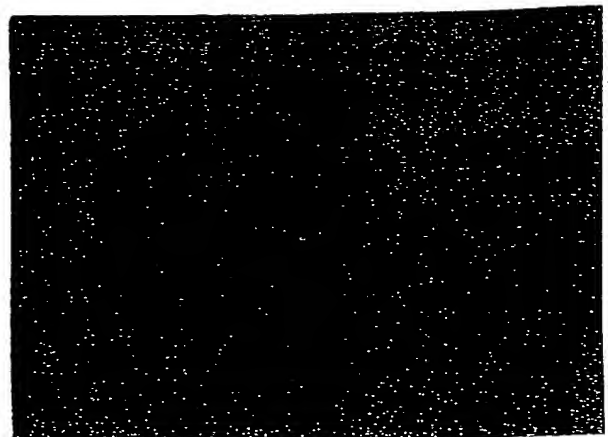
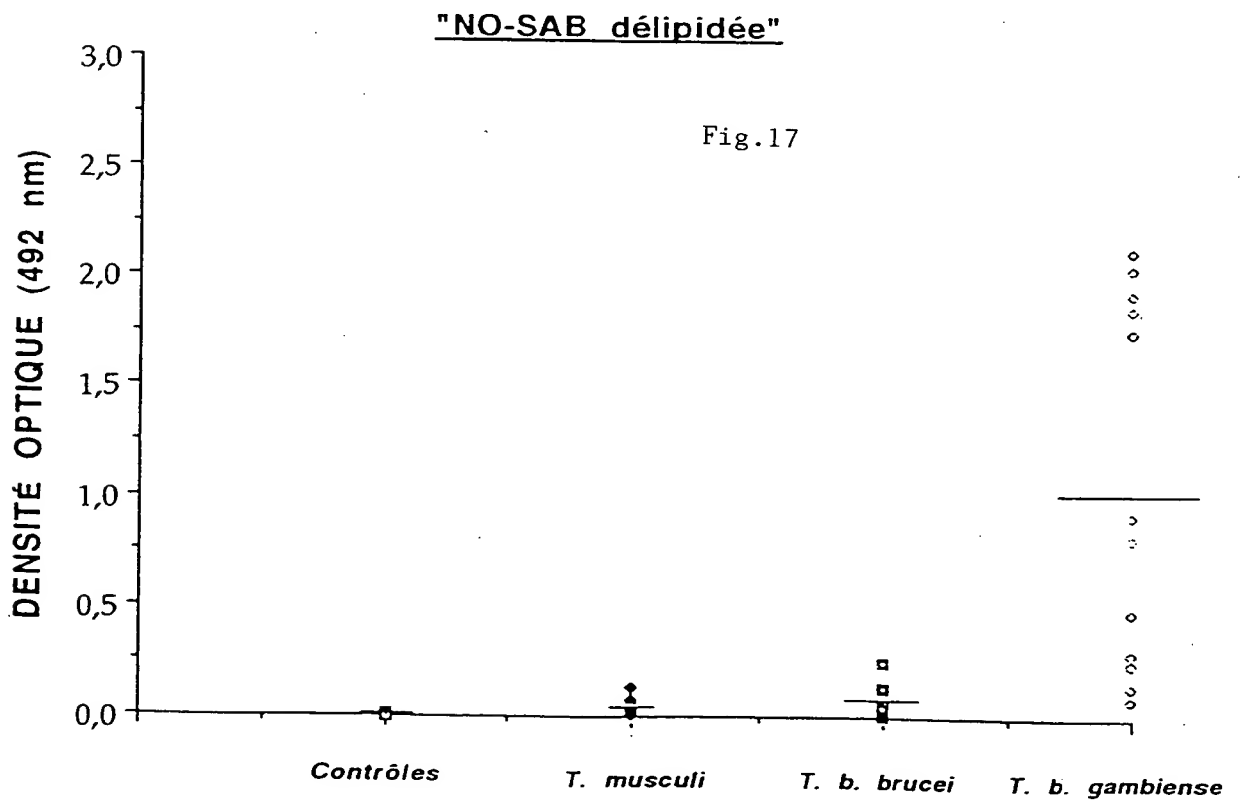
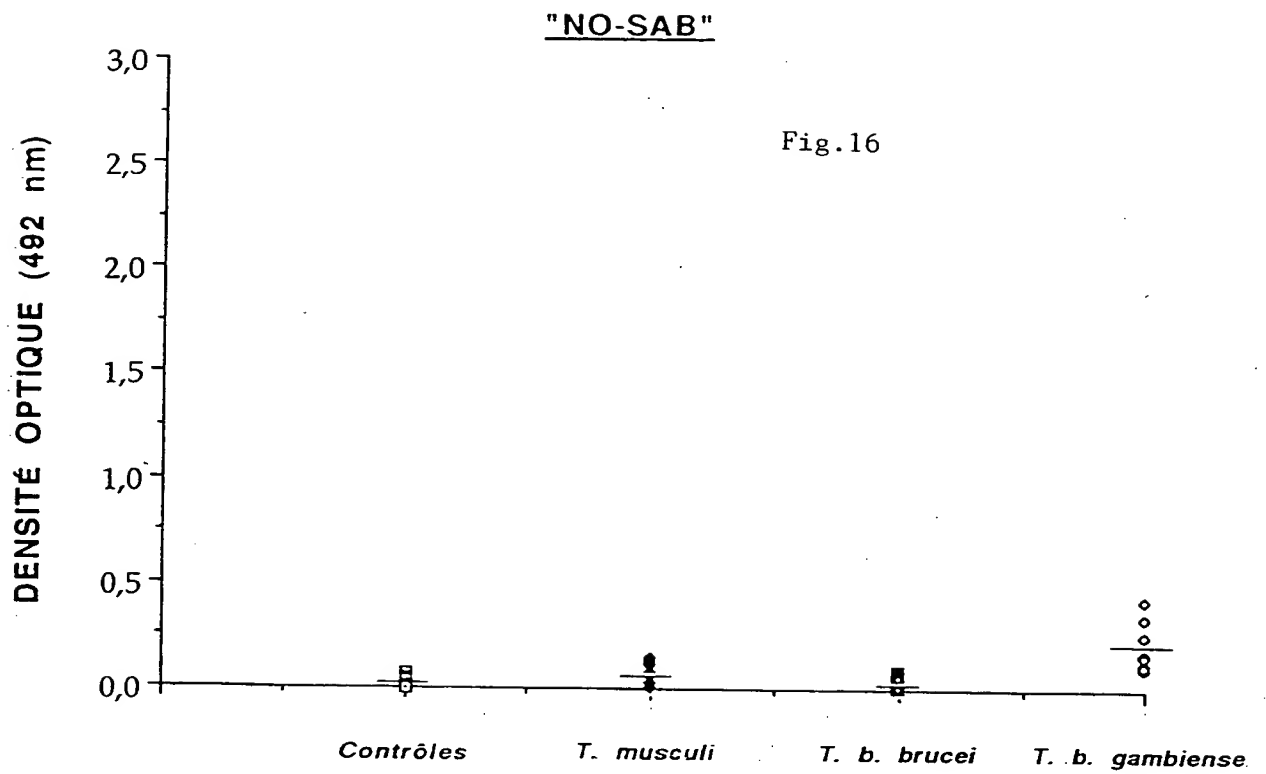
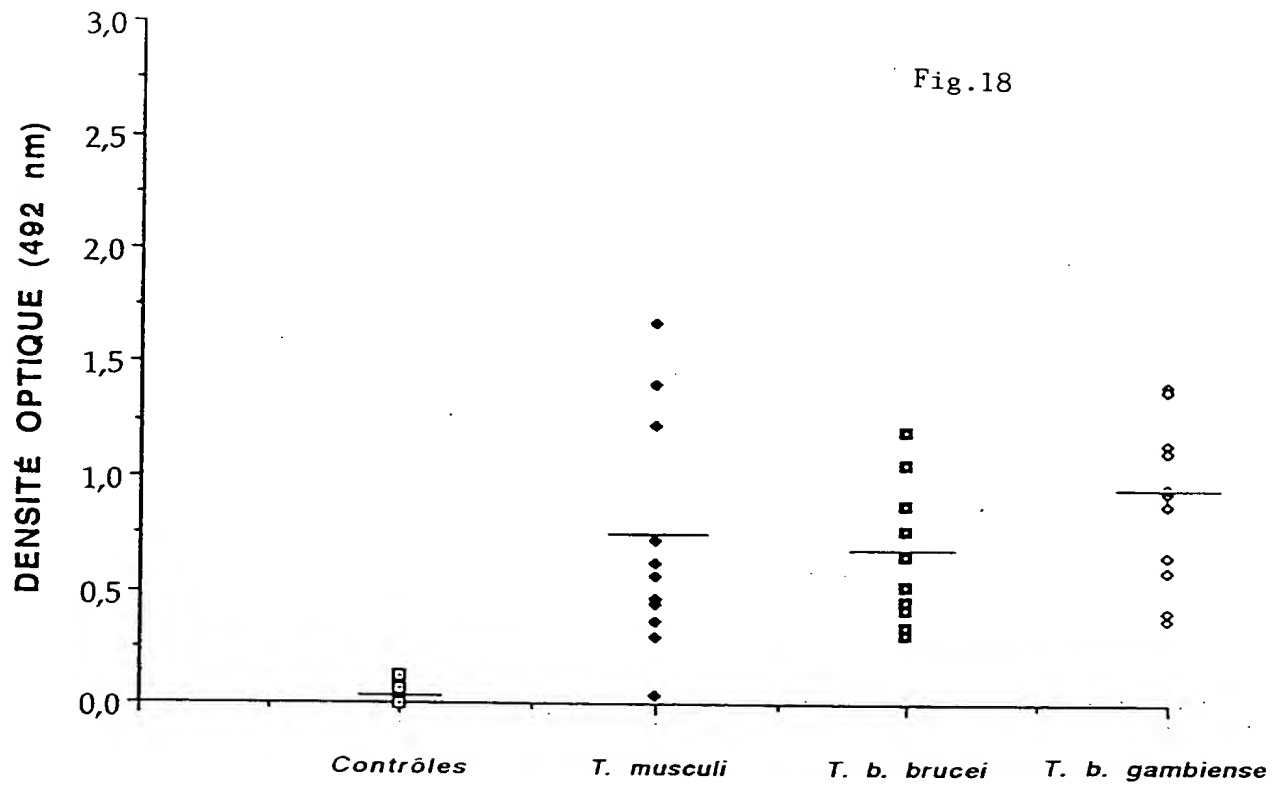
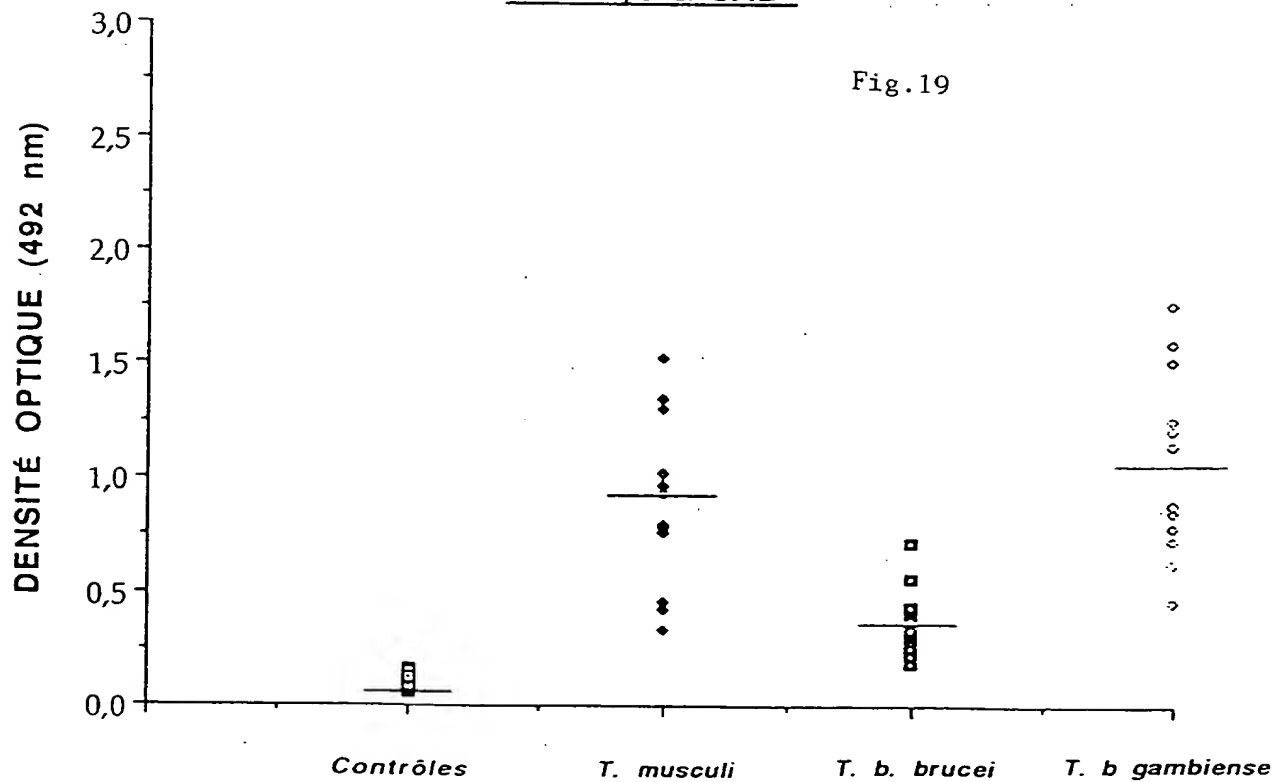


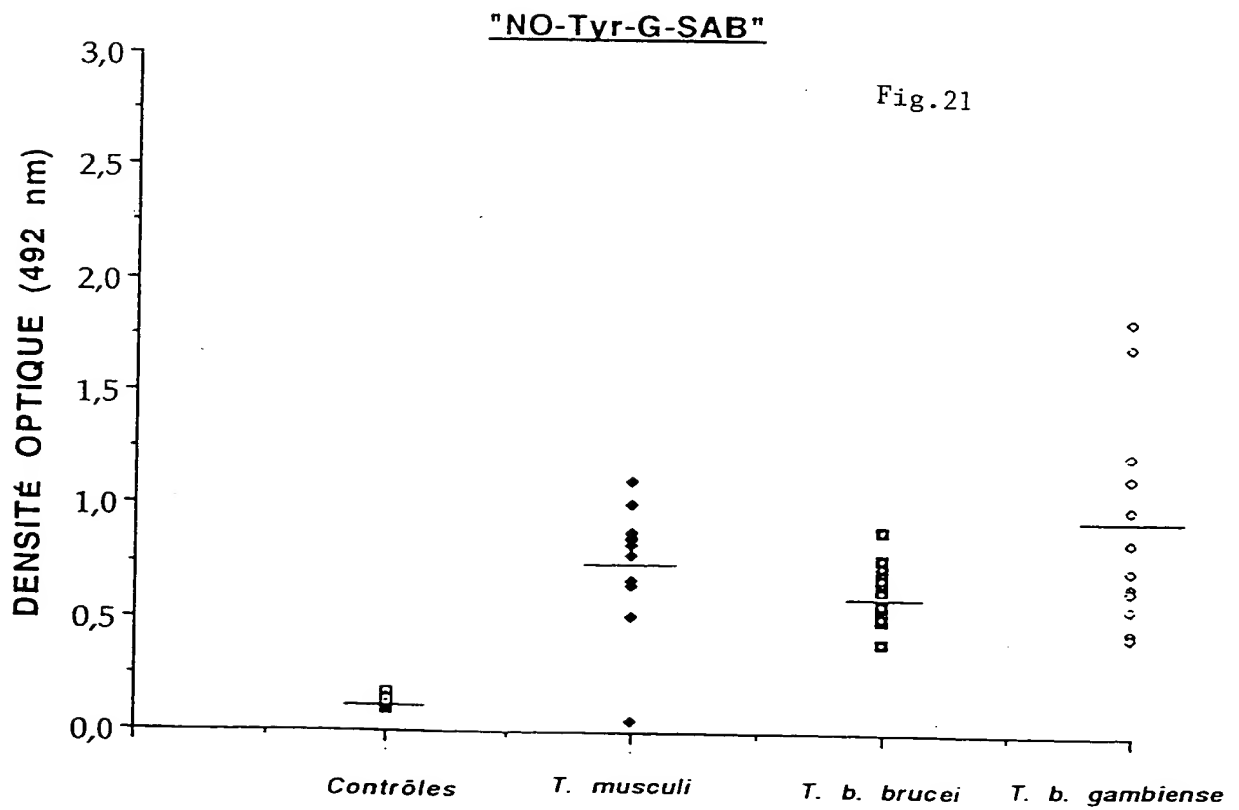
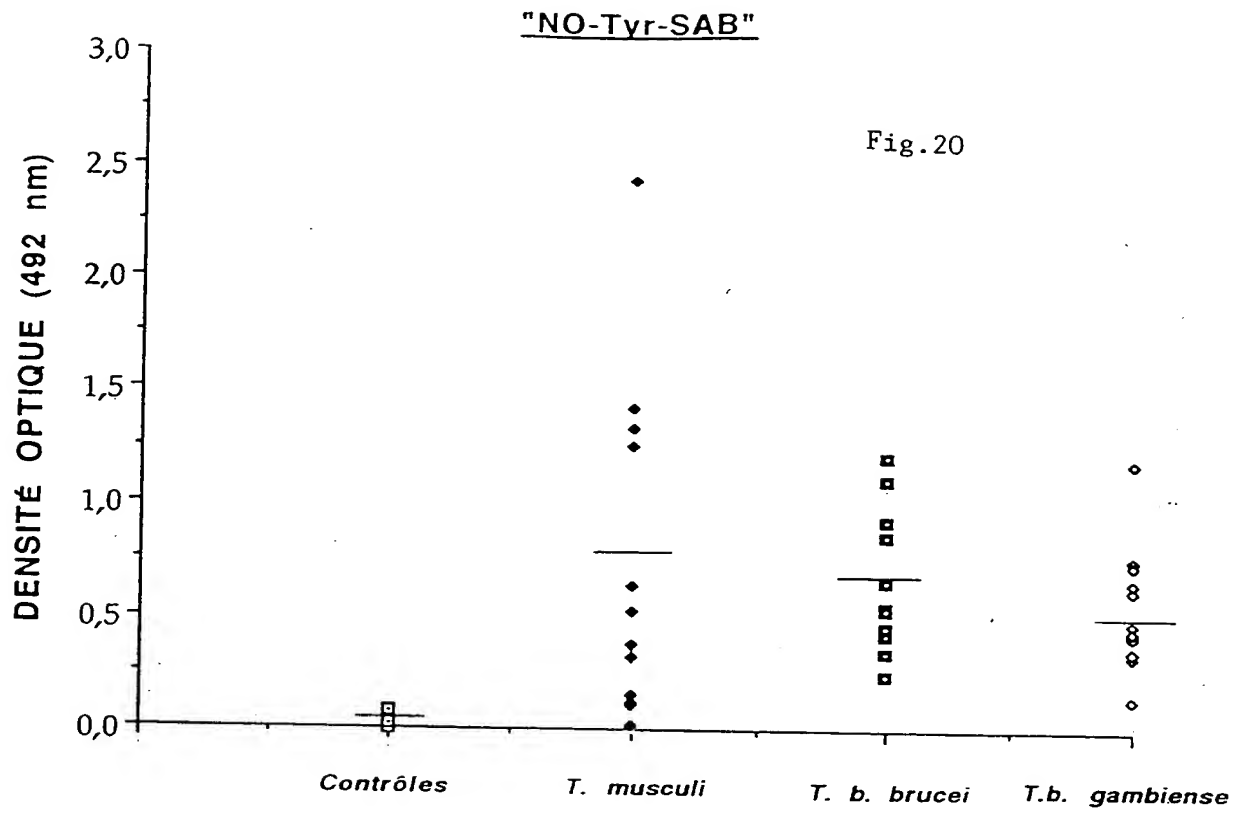
Photo IV - 6. "Sérum de lapin normal  
+ macrophages BCG"

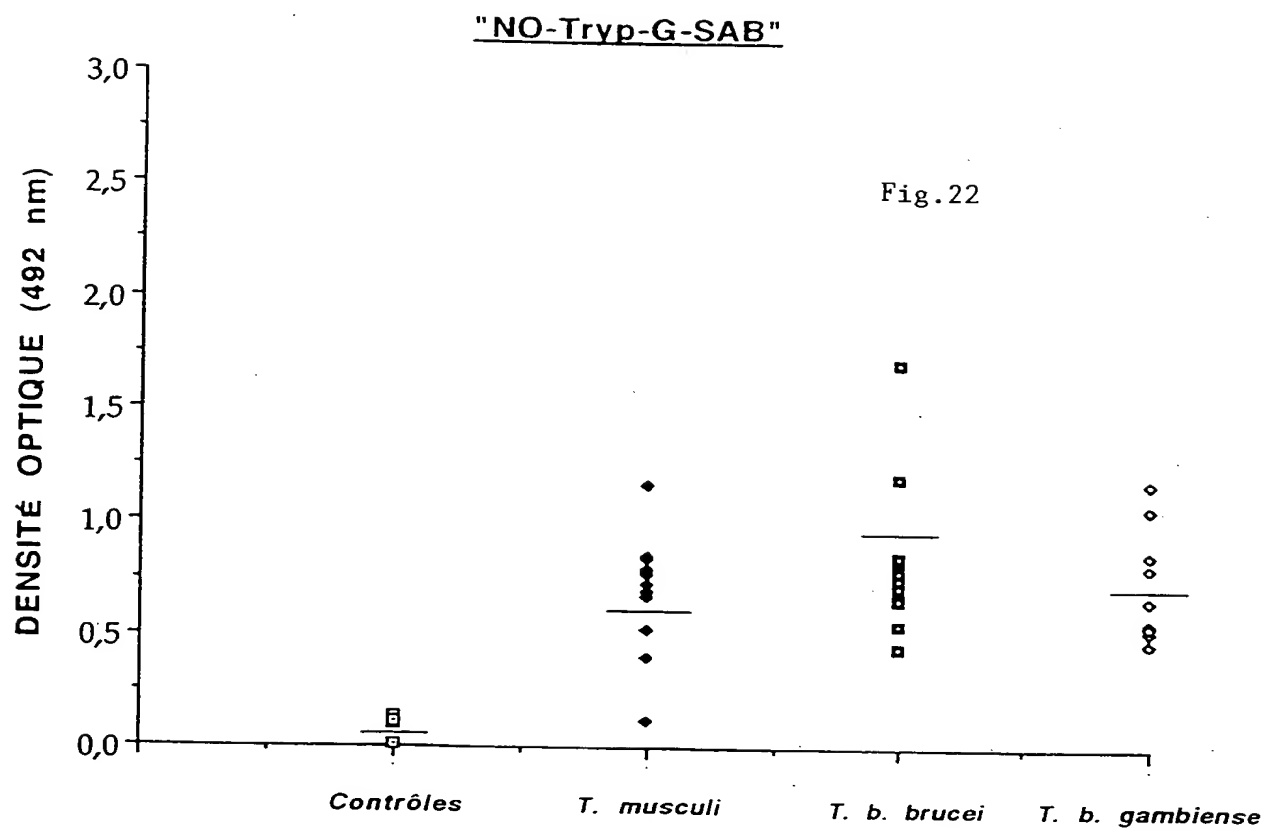






"NO-Cys-SAB""NO-Cys-G-SAB"





Fig;23

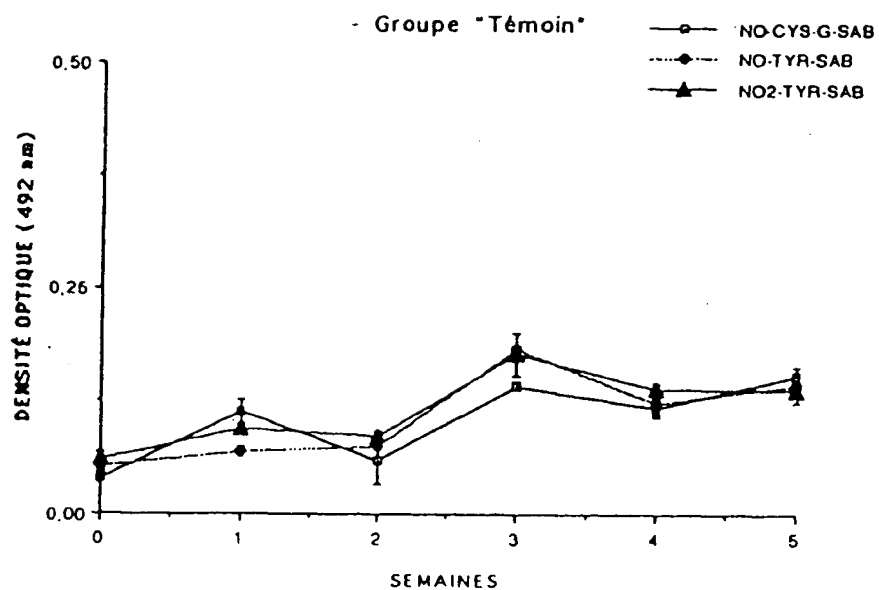
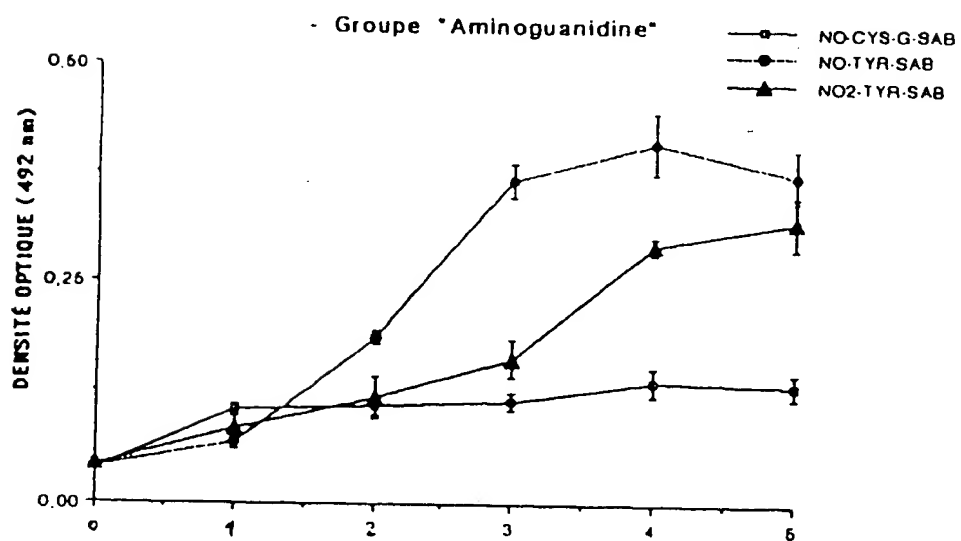


Fig.24



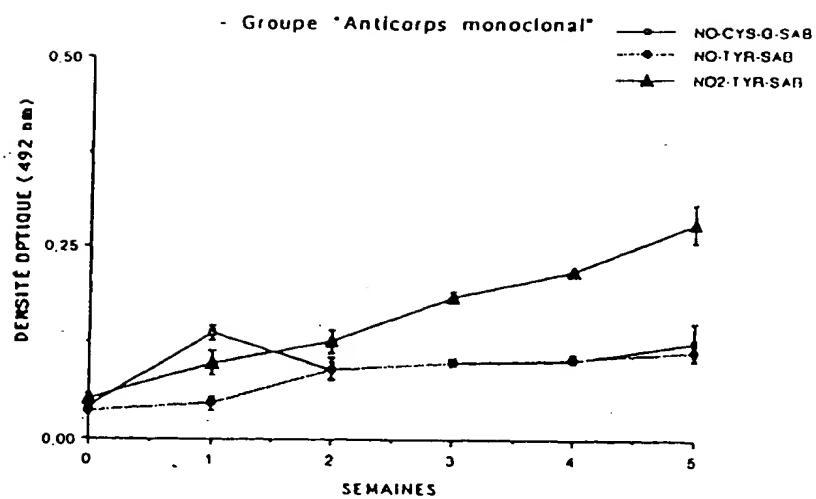


Fig.25

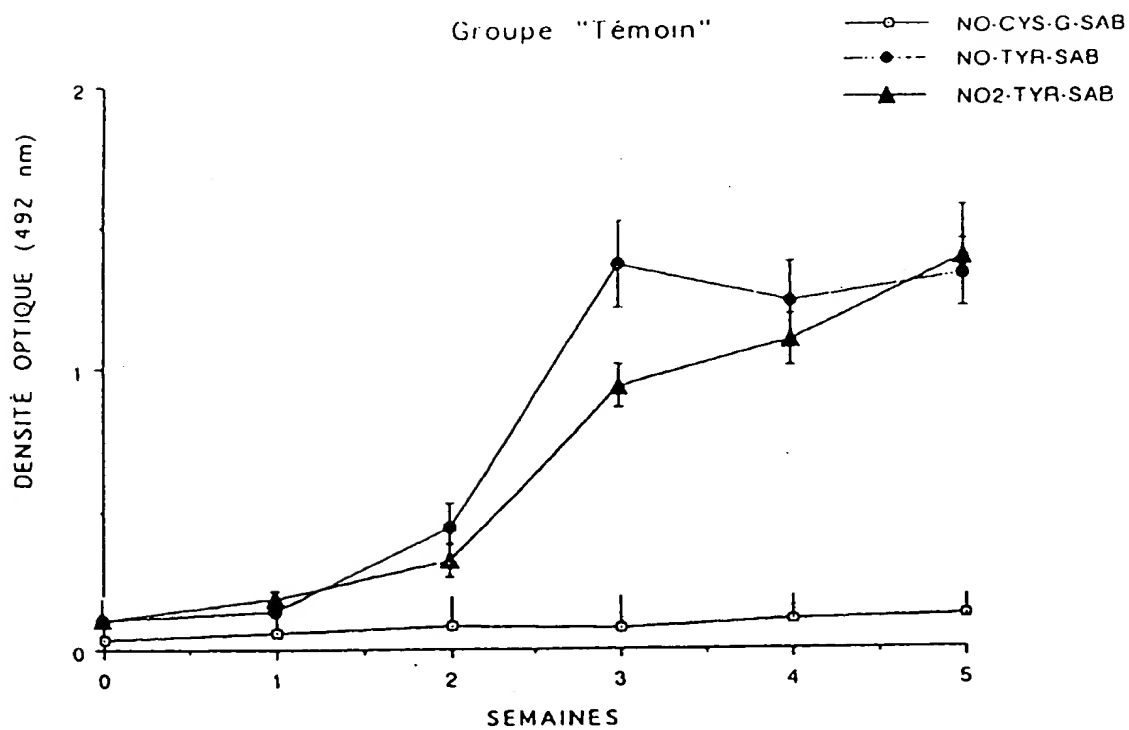


Fig.26

Fig.27

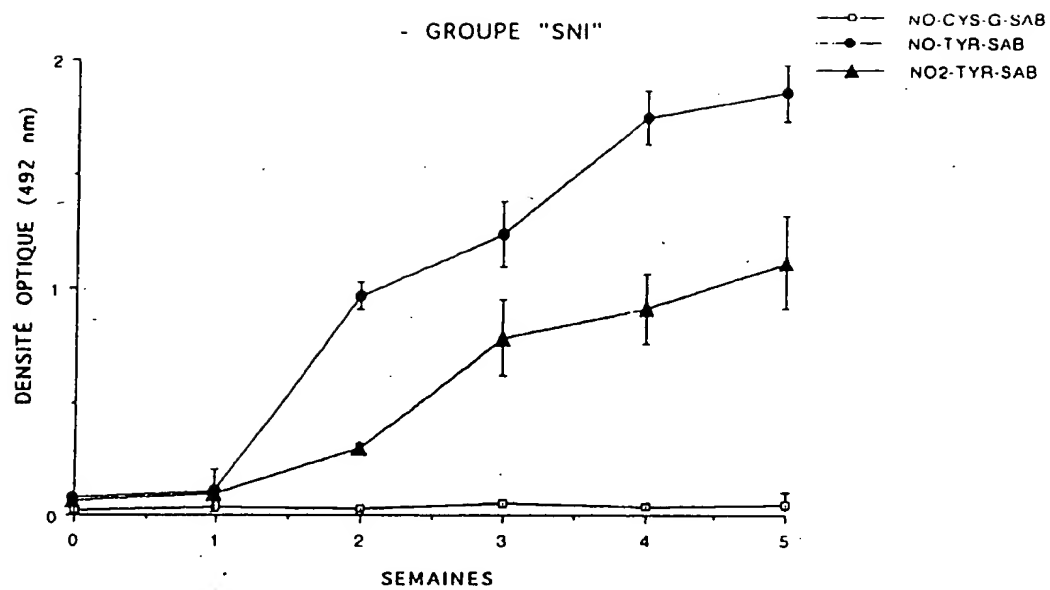


Fig.28

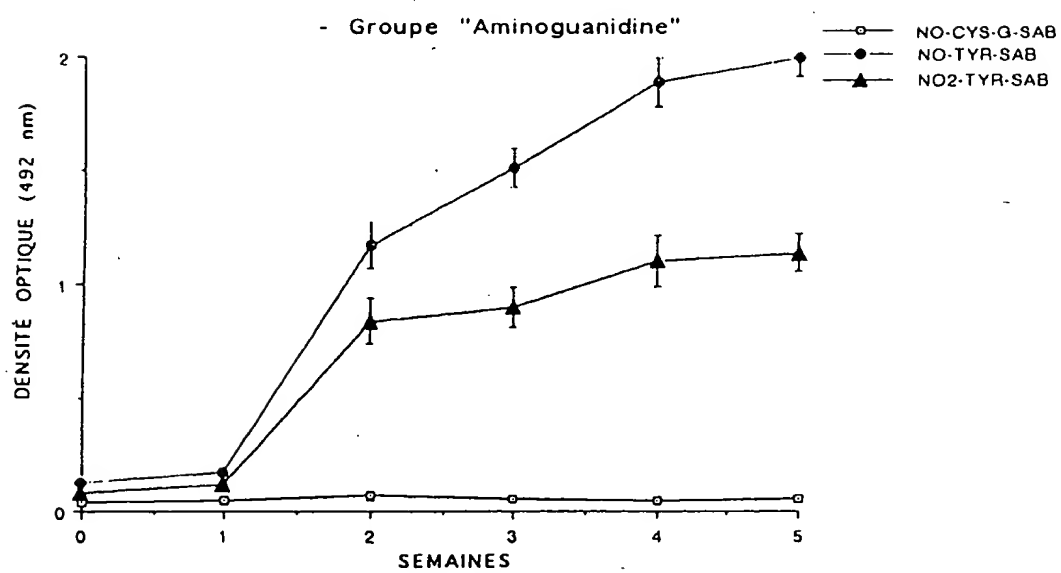
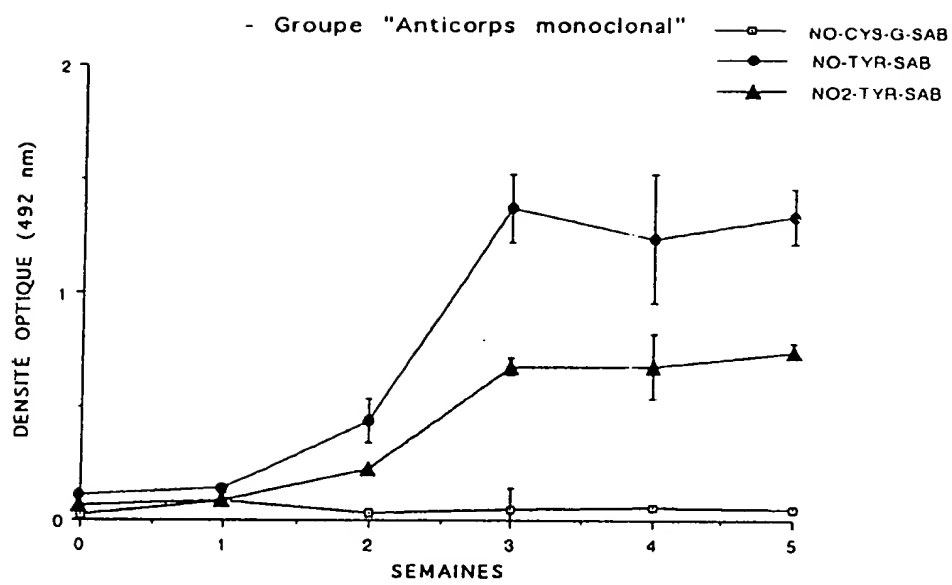


Fig.29



7-



# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.



1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
YE Y. Z. ET AL., : "Antibodies that recognize nitrotyrosine" METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 269, - 1996 Pages 201 - 209, XP002041254 * le document en entier *	1-10, 13, 14
WO 96 04311 A (UNIV ALABAMA AT BIRMINGHAM RES) 15 Février 1996 * le document en entier *	1-3, 5-14
WO 95 07691 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL ; FOLTS JOHN D (US)) 23 Mars 1995 * le document en entier *	7-10
2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
WIZEMANN T. ET AL., : "Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia" J. LEUKOCYTE BIOLOGY, Vol. 56, no. 6, 1994, Pages 759 - 768, XP002041255	
WO 94 11348 A (UNIV PENNSYLVANIA ; UNIV ROCHESTER US)) 26 Mai 1994	
US 4 835 258 A (HOLLENBERG PAUL F ET AL) 30 Mai 1989	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

